

Aus dem Johannes Müller Institut für Physiologie

des Universitätsklinikums Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Morphologische, immunphänotypische und
elektrophysiologische Eigenschaften
deaktivierter muriner Mikroglia *in vitro***

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Tom Schilling

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Heinemann

2. Prof. Dr. P. Grafe

3. Prof. Dr. F. Dreyer

eingereicht: 04.10.2000

Datum der Promotion: 16.07.2001

Murine Mikroglia kulturen wurden mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) in einen deaktivierten Zustand überführt. Dies wurde anhand morphologischer (Grad der Ramifizierung) und immunologischer (Expression von Adhäsionsmolekülen) Parameter verifiziert. Durch den Einsatz von Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (M-CSF), Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) und den gegen sie gerichteten Antikörpern wurde gezeigt, daß alle untersuchten Zytokine in unterschiedlichem Maße an der Deaktivierung der Mikrogliazellen durch ACM beteiligt sind. Außerdem wurde nach Stimulation mit ACM an murinen Mikrogliazellen eine transiente Hochregulation eines Kaliumauswärtsstromes beobachtet. Das Auftreten dieses Kaliumstromes nach Inkubation der Mikrogliazellen mit ACM konnte auf die Wirkung von TGF- β , welches im ACM enthalten ist, zurückgeführt werden. Der durch ACM in deaktivierter Mikroglia induzierte Kaliumkanal entsprach in seinen kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften am ehesten dem klonierten Kanal Kv1.3. Die Kv1.3 Expression durch TGF- β oder ACM war durch den unspezifischen Proteinkinaseinhibitor H7 unterdrückbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Expression des Kv1.3 Kanals nicht, wie bisher angenommen, ein Indikator für aktivierte Mikroglia ist.

Gehirnmakrophage, Ionenkanal, TGF- β , Kv1.3

Murine microglial cultures were deactivated with astrocyte-conditioned medium (ACM). The deactivation process was verified measuring morphological (ramification index) and immunological (expression level of adhesion molecules) parameters. By using macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), transforming growth factor β (TGF- β) and their corresponding antibodies it was shown, that to a different extent all of these cytokines influence the deactivation process of microglial cells by ACM. ACM treatment of microglial cultures also lead to a transient upregulation of a delayed potassium outward current. This upregulation was due to the impact of TGF- β contained in ACM. The ACM induced potassium channel resembled in its kinetic and pharmacological properties the cloned Kv1.3 channel. Expression of Kv1.3 in microglial cells by TGF- β or ACM was inhibited by the unspecific protein kinase inhibitor H7. These results show, that expression of Kv1.3 channels is not a special feature of activated microglia, which has been proposed in recent publications.

brain macrophage, ion channel, TGF- β , Kv1.3

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	9
1.1 MORPHOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER MIKROGLIAZELLEN	9
1.2 INTERAKTION VON MIKROGLIAZELLEN MIT NEURONEN UND GLIAZELLEN	12
1.3 PATHOPHYSIOLOGISCHE IMPLIKATIONEN	14
1.4 IONENKANÄLE IN MIKROGLIAZELLEN	17
1.5 FRAGESTELLUNG DIESER DISSERTATION	23
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 HERSTELLUNG VON MIKROGLIAZELLKULTUREN	24
2.1.1 <i>Präparation der Primär- und Sekundärkulturen.....</i>	<i>24</i>
2.1.2 <i>Behandlung der Mikrogliazelllinie BV-2.....</i>	<i>24</i>
2.1.3 <i>Behandlung der Mikrogliazellkulturen mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) und Zytokinen</i>	<i>25</i>
2.2 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	26
2.2.1 <i>Anfertigung der Patchpipetten.....</i>	<i>26</i>
2.2.2 <i>Durchführung der Patch-clamp-Messungen</i>	<i>27</i>
2.2.3 <i>Extra- und intrazelluläre Lösungen.....</i>	<i>27</i>
2.2.4 <i>Pharmakologische Untersuchungen.....</i>	<i>28</i>
2.2.5 <i>Datenaufzeichnung und –analyse</i>	<i>30</i>
2.2.6 <i>Systematische Fehler und deren Behebung.....</i>	<i>32</i>
2.3 IMMUNZYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	35
2.4 MORPHOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG	36
3 ERGEBNISSE	38
3.1 MORPHOLOGISCHE UND IMMUNPHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER MIKROGLIAZELLKULTUREN	38
3.2 IDENTIFIKATION DER ASTROZYTÄREN FAKTOREN, WELCHE DIE MORPHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN BEWIRKEN	41

3.3	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE ANALYSE SPANNUNGSAKTIVIERTER KALIUMKANÄLE IN RUHENDER MIKROGLIA.....	44
3.4	BESTIMMUNG DES ASTROZYTÄREN FAKTORS, DER DEN SPANNUNGSAKTIVIERTEN KALIUMAUSWÄRTSSTROM INDUZIERT	46
3.5	UNTERSUCHUNG DER EINWÄRTS GLEICHRICHTENDEN KALIUMSTRÖME AN TGF- β BEHANDELTEN MIKROGLIAZELLEN.....	48
3.5.1	<i>Vergleich der Stromdichten</i>	48
3.5.2	<i>Pharmakologische Charakterisierung der Einwärtsströme</i>	49
3.6	DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DES DURCH TGF- β INDUZIERTEN KALIUMAUSWÄRTSSTROMES I_{DR}	51
3.6.1	<i>Vergleich der Stromdichten</i>	52
3.6.2	<i>Kinetische Charakteristika des Kaliumauswärtsstromes</i>	53
3.6.3	<i>Ermittlung der pharmakologischen Eigenschaften des induzierten Kaliumauswärtsstromes</i>	58
3.6.4	<i>Untersuchungen zur intrazellulären Signalkaskade der Induktion des I_{DR} durch TGF-β</i>	60
4	DISKUSSION	64
4.1	DEAKTIVIERUNG DER MIKROGLIAZELLEN MIT ACM.....	64
4.2	IDENTIFIKATION DER FÜR DIE MORPHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN VERANTWORTLICHEN ZYTOKINE	66
4.3	VERÄNDERUNG DER KALIUMKANALEXPRESSION BEI DEAKTIVIERTER MIKROGLIA	68
4.4	BESTIMMUNG DER KALIUMKANALTYPEN IN DEAKTIVIERTEN MIKROGLIAZELLEN	69
4.5	EINFLUß VON PROTEINKINASEN AUF DEN DURCH TGF- β INDUZIERTEN KALIUMAUSWÄRTSSTROM	72
4.6	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DES KALIUMAUSWÄRTSSTROMES IN DEAKTIVIERTER MIKROGLIA.....	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	81
7	CHEMIKALIENNACHWEIS.....	91
8	ERKLÄRUNG ZUR VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN.....	92

9	DANKSAGUNG	93
10	ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBSTÄNDIGKEIT BEI DER ANFERTIGUNG DER ARBEIT	94

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACM	Astrozyten-konditioniertes Medium
anti-pan-TGF- β	Antikörper gegen TGF- β 1,2,3,4,5
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Proteinkinase Typ II
CRAC	kalziumfreisetzungsaktivierte Kalziumkanäle (calcium release-activated calcium channel)
CTX	Charybdotoxin
DAB	3,3'-diaminobenzidine
dBcAMP	N ⁶ ,2'-O-Dibutyryl-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNAse	Desoxyribonuklease
EGTA	Ethyleneglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FCS	fötales Kälberserum
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
Genistein	4',5,7-Trihydroxyisoflavone
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
H7	1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine, HCl
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HERG	human ether-a-go-go ähnliches Genprodukt
HIV	humanes Immunodefizienzvirus
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule)
I _{DR}	auswärts gerichteter Kaliumstrom
IFN- γ	Interferon- γ
I _{IR}	einwärts gleichrichtender Kaliumstrom
IL-1,2...	Interleukin-1,2...
KN-93	N-(2-[N-[4-Chlorocinnamyl]-N-methylaminomethyl]phenyl)-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulfonamide

KTX	Kaliotoxin
LFA	Lymphozytenfunktionsantigen (lymphocyte functional antigen)
LJP	Liquid Junction Potential
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MS	Multiple Sklerose
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NGS	normales Ziegenserum
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RI	Ramifikationsindex
S.E.M.	Standardabweichung vom Mittelwert
sgk	Serum/Glukokortikoid regulierte Proteinkinase
TGF- β 1,2,3...	Transforming Growth Factor β 1,2,3...
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
α -DTX	α -Dendrotoxin
δ -DTX	δ -Dendrotoxin

1 Einleitung

Biologische Lebewesen können in der Umwelt nur dann existieren, wenn es ihnen gelingt, sowohl mit ihrer Umwelt in Stoff- und Energieaustausch zu treten, als auch ihr internes Milieu in Homöostase zu halten. Dieses allgemeine Funktionsprinzip gilt sowohl für Einzeller, die sich mittels der Zellmembran gegen die Umwelt abgrenzen, als auch für höhere Organismen, die für die verschiedenen Aufgaben eine Reihe spezialisierter Zellverbände entwickelt haben; ebenso ist dieses Prinzip auf der Organebene höherer Lebewesen zu finden.

Der menschliche Körper besitzt, wie alle Säugetiere, eine Reihe von Möglichkeiten, um Störungen der Homöostase durch abgestorbene Zellen oder eindringende Organismen zu beseitigen. Neben der Haut als „präventives“ Organ gibt es eine Vielzahl von Zellen, die sich auf diese Immunaufgabe spezialisiert haben. Funktionell läßt sich die Immunantwort entsprechend der Spezifität, d.h. der Notwendigkeit eines Antigens, unterteilen. Die unspezifische Abwehr, d.h. die Resistenz, wird hauptsächlich vom Komplementsystem, den Phagozyten und den neutrophilen Granulozyten vermittelt; die spezifische Reaktion, d.h. die Immunität, erfordert eine Kooperativität von Makrophagen, Immunglobulinen und Lymphozyten.

Die Phagozyten können neben der im Blut zirkulierenden auch als residente Form, den Gewebemakrophagen, auftreten, wobei sie organspezifische Veränderungen erfahren. Typische Beispiele des mononukleären phagozytierenden Systems sind die Kupfferschen Sternzellen der Leber, intraglomeruläre Mesangiumzellen in der Niere, Osteoklasten im Knochengewebe und die Mikroglia, die mit zirka 15 bis 20 Prozent zur Zellzahl im adulten zentralen Nervensystem beiträgt (Pratt & McPherson 1997).

1.1 Morphologische und immunologische Eigenschaften der Mikrogliazellen

Die Mikroglia wurde zuerst von Nissl 1891 beschrieben, der sie noch als „Stäbchenzellen“ bezeichnete. Er sah sie als reaktive Neuroglia an, die zur Phagozytose und Migration befähigt ist.

Das Verständnis von der Ontogenese und Funktion der Mikrogliazellen wurde erheblich von del Rio-Hortega vorangetrieben. Aufgrund von mikroskopischen Färbungsuntersuchungen konnte er zwar nicht ausschließen, daß die Mikroglia von leptomeningealen Zellen abstammt, favorisierte wegen der phagozytotischen Eigenschaften jedoch die Vorstellung, daß die Mikrogliazellen von Blutzellen abstammen und demzufolge mesodermalen Ursprungs seien (del Rio-Hortega 1932). Diese Theorie wurde in den siebziger Jahren in Frage gestellt, als die Hypothese aufgestellt

wurde, daß die Mikroglia von neuroektodermalen Zellen abstammt, wie man es für Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten annimmt (Fujita & Kitamura 1975, Fedoroff et al. 1997). Eine Vielzahl von Einzeluntersuchungen stützt diese Behauptung nicht. Das heutige Verständnis über die Herkunft der Mikroglia, das auf Verfahren der Immunhistochemie, der Enzymbestimmung sowie der Lektinnachweise beruht, sei hier kurz dargelegt.

Nach diesen Befunden findet in der späten Embryonalentwicklung und der frühen postnatalen Phase eine Einwanderung der zirkulierenden Monozyten oder, wahrscheinlicher, einer hämatopoetischen Vorläuferzelle der Monozyten-/Makrophagenlinie (Ono et al. 1999) in das Parenchym des Gehirns statt. Diese Einwanderung vollzieht sich vermutlich aus den einsprossenden Gefäßen, dem Liquorraum und über die pialen Meningen. Inwieweit diese unterschiedlichen Bahnen verschiedene Subpopulationen der Mikroglia hervorrufen (Provis et al. 1996), bleibt zur Zeit eine unbeantwortete Frage. Prädilektionsstellen der perinatalen Einwanderung sind das Corpus callosum, das ventromediale Tectum sowie die cerebellären Pedunculi. Von hier aus erfolgt eine Verteilung der Mikroglia über das gesamte Hirngewebe; sie hat dabei eine als amöboid bezeichnete Morphologie, die sich durch etwa 10 µm große Zellsomata, Fehlen von Zellausläufern, eine hohe Proliferationsrate sowie ausgeprägte Migration auszeichnet. Diese wird vermutlich durch die absterbenden Neurone, etwa die Hälfte der sich entwickelnden Nervenzellen werden apoptotisch (Moore & Thanos 1996), bzw. durch von ihnen abgegebene Chemoattraktoren geleitet und gefördert. Der durch die Apoptose hervorgerufene Zelldebris wird dann von der eingewanderten Mikroglia phagozytiert und enzymatisch abgebaut.

Ist der Untergang von Nervenzellen im Entwicklungsprozeß abgeschlossen, findet eine Transformation der Zellen in ihre reife, ramifizierte Form statt, wie es bereits von del Rio-Hortega vermutet wurde. Diese Ramifizierung ist anatomisch durch eine Verringerung des Somavolumens, eine Bildung ausgeprägter Verzweigungen (sogenannter Rami), die sich über ein Gebiet von mehr als 100 µm erstrecken können, sowie ein sessiles Verhalten gekennzeichnet. Diese Gestaltänderung wird als transitiver Prozeß angesehen, bei der Intermediärstufen auftreten (Ling & Wong 1993, Perry et al. 1985).

Im gesunden adulten Gehirn kann man nahezu ausschließlich ramifizierte Mikrogliazellen finden. Neuere Untersuchungen mit grünem fluoreszierenden Protein (GFP) und radioaktiv markierten Zellen (Lawson et al. 1992) untermauern die Hypothese, daß nicht nur die Proliferation, sondern eine ständige Einwanderung von Monozyten in das Gehirngewebe, auch bei intakter Blut-Hirn-Schranke, zum Erhalt der Mikrogliapopulation beiträgt.

Das Auftreten der amöboiden Mikroglia ist nicht auf den Zeitraum der Gehirnentwicklung beschränkt. Tritt ein pathologisches Ereignis ein, so wandeln sich die ramifizierten Zellen wieder in ihre amöboide Form um. Dies wurde u.a. in Modellen der peripheren Fazialisläsion (Kreutzberg 1968), bei erblicher Retinitis pigmentosa an Ratten (Bok & Hall 1971) sowie bei traumatischer Läsion in organotypischen Kulturen des entorhinalen Kortex/Hippokampus (Bechmann & Nitsch 1997) nachgewiesen. Bei Restitution des Gewebes findet eine morphologische Retransformation statt.

Die Änderung der Morphologie ist mit einer Modifikation des immunologischen Status verbunden. So konnte, begleitend zu einer Umwandlung der ramifizierten zur amöboiden Mikroglia, eine transiente Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle Very Late Antigen 4 (VLA-4) sowie des Lymphozytenfunktionsantigens 1 (LFA-1) in den oben erwähnten organotypischen Kulturen beobachtet werden (Hailer et al. 1996). Das zur Klasse der Integrine gehörende LFA-1, welches häufig auf hämatopoetischen Zellen zu finden ist, kann ein Ligand für das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) sein, das auch oft auf nichthämatopoetischem Gewebe gefunden werden kann. Ebenfalls konnten im Rahmen der morphologischen Veränderungen nach Fazialisläsion (Streit et al. 1988) sowie nach Kainat- und Ischämieschädigung (Finsen et al. 1993) eine stärkere Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse I und II gezeigt werden. Antigene der Klasse I haben eine elementare Bedeutung für die durch T-Lymphozyten vermittelte Zytotoxizität; MHC der Klasse II spielt eine Rolle bei der Antigenpräsentation für T-Helferzellen, bei der Induktion der Antikörperproduktion in B-Lymphozyten sowie bei der Stimulation der Lymphokinproduktion, die die Makrophagen beim Abtöten intrazellulärer Mikroorganismen unterstützt (Owen 1991).

Diese bakterizide Funktion der Mikroglia wird, wie bei anderen Makrophagen auch, durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen ermöglicht. Dazu wird ein Enzym, die NADPH-Oxidase, aktiviert, die über die intrazelluläre Spaltung von NADPH in NADP und Protonen ein Elektron freisetzt, das über die Zellmembran verschoben und extrazellulär bzw. im Phagosom auf ein Sauerstoffmolekül übertragen werden kann. Dadurch entstehen freie Sauerstoffradikale, die enzymatisch über das Intermediärprodukt Wasserstoffperoxid bakterizide Substanzen wie Peroxynitrit oder Chloramine bilden (Shatwell & Segal 1996).

Eine Voraussetzung für die intrazelluläre Lyse ist die Endozytose der Mikroorganismen bzw. der Zelltrümmer. Die phagozytotischen Fähigkeiten von Mikroglia wurde u.a. im Fazialisläsionsmodell (Graeber et al. 1988) und im Modell der erblichen Photorezeptordegeneration (Bok & Hall 1971) nachgewiesen. Dabei wird das Bakterium in ein Phagosom eingeschlossen, das mit

einem von der Mikroglia gebildeten Lysosom, in dem sich bakterizide Proteine und die bereits erwähnten Sauerstoffradikale befinden, verschmilzt. Faktoren, die die Anlagerung der Mikrogliazellen/Makrophagen an ein Bakterium befördern, sind nach Rook 1991a:

- LFA-1, das sich an β -Glukane und Lipopolysaccharid (LPS), einem Endotoxin gramnegativer Bakterien, anlagern kann
- Lektine auf der Oberfläche von Mikrogliazellen bzw. der Bakterien
- Fc-Rezeptoren, die sich mit an Bakterien haftenden Antikörpern verbinden
- Komplementrezeptoren CR3 und p150-95, die zu einer Opsonierung des Bakteriums führen

Bei Auftreten pathologischer Bedingungen im Gehirn sind Mikrogliazellen deshalb zu einer umfassenden Immunantwort befähigt.

1.2 Interaktion von Mikrogliazellen mit Neuronen und Gliazellen

Nicht erst seitdem die Ergebnisse der Psychoneuroimmunologie eine breitere Resonanz in der wissenschaftlichen Diskussion fanden, ist es bekannt, daß Immunzellen in einem intensiven Kontakt mit den sie umgebenden Parenchymzellen stehen. Dies ist notwendig, da nur durch ständige Kontrolle einer Reihe von Parametern ausgeschlossen werden kann, daß pathologische Prozesse im Gewebe ablaufen und bei Abweichungen sofort eine entsprechende Immunreaktion eingeleitet wird.

Prinzipiell kann zwischen den Mikrogliazellen einerseits und den Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten andererseits eine Kommunikation auf zwei verschiedenen Wegen stattfinden. Diese ist zum einen durch direkte Zell-Zell-Interaktion und zum anderen durch Signalgebung mittels löslicher Faktoren vorstellbar. Vermutlich sind beide Möglichkeiten in gleichem Umfang an der physiologischen und pathophysiologischen Regulation beteiligt, auch wenn einzelne Autoren die Relevanz einer Seite betonen.

Von Sudo und Kollegen (Sudo et al. 1998) wurde mittels zytochemischer und spektrophotometrischer Analysen nachgewiesen, daß sich die Sauerstoffradikalproduktion von Mikrogliazellen durch Kokultur mit Neuronen erhöht. Diese Zunahme wurde ebenfalls bei Zugabe von neuronalen Membranfragmenten gesehen; der Effekt war durch Trypsin oder Neuraminidase antagonisierbar. Kamen die Mikrogliaulturen mit Medium, in dem vorher Astrozyten oder Neurone kultiviert wurden, in Kontakt, so konnte ebenfalls eine gesteigerte Konzentration von Superoxidradikalanionen gemessen werden. Die Mikrogliazellen sind demzufolge sowohl durch

zelluläre Bestandteile der Neuronenmembran als auch durch lösliche Faktoren, die von Neuronen produziert werden, in ihrer Immunantwort modulierbar.

Eine ähnliche Dualität konnte auch für den Einfluß von Astrozyten auf die morphologischen Veränderungen (Sievers et al. 1994, Wilms et al. 1997) oder die phagozytotische Leistung (von Zahn et al. 1997, DeWitt et al. 1998) gezeigt werden.

Besonders gut untersucht ist das Zytokinnetzwerk, mit dem sich Mikroglia, Astrozyten, Neurone, Endothelzellen und Oligodendrozyten gegenseitig beeinflussen können. Zytokine sind niedermolekulare Glykoproteine, die im Verlauf der Organentwicklung oder von Entzündungsreaktionen das Zellverhalten modulieren können.

In der Ontogenese spielen vor allem die koloniestimulierenden Faktoren wie der Makrophagen koloniestimulierende Faktor (M-CSF), der Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) und der Granulozyten koloniestimulierende Faktor (G-CSF) eine Rolle für die Proliferation und Differenzierung. Im Rahmen von Entzündungsprozessen kann man nach ihrer Wirkung zwei Hauptgruppen unterscheiden: proinflammatorisch wirkende Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-1 (IL-1) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und antiinflammatorisch wirkende wie transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β), Interleukin-4 (IL-4) oder Interleukin-10 (IL-10). Erschwert wird die Betrachtungsweise der Auswirkung von Zytokinen durch die Tatsache, daß sie sich in ihrer Freisetzung oder in der Mediation ihres Effektes gegenseitig beeinflussen können. Folgende Wirkprinzipien sind bekannt:

- direkte Zytokinwirkung: TNF- α bewirkt an Mikrogliazellen die Ausschüttung von TGF- β (Chao et al. 1995a)
- Antagonismus zwischen einzelnen Zytokinen: TGF- β inhibiert die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α (Chao et al. 1995b) und die Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen durch IFN- γ (Loughlin et al. 1993)
- Synergismus verschiedener Zytokine: Makrophagen werden nur bei gleichzeitiger Signalgebung durch IL-2 und IFN- γ vollständig aktiviert (Rook 1991b)

Die Interferenz zwischen den Zytokinen kann zeit- und konzentrationsabhängig sein. In Mikrogliaulturen wurde für IL-4 und IFN- γ nachgewiesen, daß sie in Abhängigkeit ihrer Konzentrationen und der Reihenfolge ihrer Applikation additiv oder antagonistisch wirken können (Loughlin et al. 1993). Die Grundlage für die Wechselwirkung der Zytokine liegt in einer biochemischen Interaktion von intrazellulären Signalmolekülen. Dies wurde beispielsweise für

IFN- γ nachgewiesen, das durch die Induktion von SMAD7 den Signalweg von TGF- β inhibiert (Ulloa et al. 1999).

1.3 Pathophysiologische Implikationen

Wie im vorigen Kapitel erläutert, sind Zytokine prinzipiell in der Lage, den Verlauf immunologischer Prozesse zu variieren. Tatsächlich wurde für eine Reihe von Zytokinen eine Beteiligung an der Pathogenese neurologischer Erkrankungen oder deren Vermittlung über Mikrogliazellen nachgewiesen. Um den tatsächlichen pathognomonischen Zusammenhang herzustellen, ist es jedoch häufig schwierig, kausale und kompensatorische Effekte zu unterscheiden.

Vom pathophysiologischen Verständnis ausgehend ist eine Beteiligung von Zytokinen an infektiösen oder autoimmunologischen Enzephalopathien schlüssig. Bei Patienten, die für das humane Immunodefizienzvirus (HIV) positiv sind, ist häufig eine Demenz vor Auftreten der Immundefizienzzeichen diagnostizierbar, was auf eine direkte Viruswirkung hinweist. Neuro-pathologisch sind weder virale RNA noch Proteine in den Neuronen oder Astrozyten nachweisbar, sondern nur, wie es für Retroviren typisch ist, in Mikrogliazellen und anderen Makrophagen (González-Scarano & Baltuch 1999), die über die CD4- und vermutlich auch über die Fc-Rezeptoren befallen werden (Moore & Thanos 1996). Der genaue Mechanismus der Nervenzellschädigung ist noch nicht geklärt, ein direkter Zellkontakt zwischen Neuronen und infizierten Makrophagen scheint aber nicht Voraussetzung für das pathologische Geschehen zu sein (Artigas et al. 1993). Dies bestärkt die Vermutung, daß Zytokine eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Demenz spielen. HIV-positive demente Patienten haben einen erhöhten Spiegel von TNF- α , als deren Hauptquelle die Mikrogliazellen identifiziert wurden (Stoll & Jander 1999). Tierexperimentell konnte nachgewiesen werden, daß eine TNF- α -Überexpression zu einer Verstärkung der Neurodegeneration und zu schweren neurologischen Defiziten führt. Ein anderer klinischer Hinweis für die Beteiligung von Zytokinen ist die Beobachtung, daß bei Patienten mit HIV-bedingter Demenz eine erhöhte Konzentration von TGF- β im Serum und im Liquor nachgewiesen wurde.

Eine immunologisch vermittelte Pathogenese wird ebenfalls für die Multiple Sklerose (MS) vermutet. Bei der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE), dem Tiermodell der MS, wird nach Präsentation des Myelins als Antigen in einem ersten Schritt eine T-Zellinfiltration beobachtet, die zu einer Mikroglia-/Makrophagenaktivierung führt. Die Ausbildung eines klinischen Krankheitsbildes ist nur zu beobachten, wenn die Lymphozyten und Mikrogliazellen

den gleichen MHC-Typ aufweisen, so daß eine Restimulation der T-Lymphozyten durch Mikroglia im Gehirn vermutet wird (Stoll & Jander 1999). Ob der experimentellen Autoimmunenzephalitis tatsächlich derselbe pathophysiologische Mechanismus wie der MS zugrunde liegt, ist aufgrund der beobachteten Unterschiede nicht gesichert. So wurden erhöhte Spiegel von TGF- β bei der EAE gefunden (Kriegelstein et al. 1995), bei aktiven MS-Läsionen jedoch, im Gegensatz zu IL-1, IFN- γ oder TNF- α , verminderte Serumkonzentrationen (Sarchielli et al. 1997). Monozyten von Patienten mit MS zeigten unter *in vitro* Bedingungen nach Zugabe von TGF- β eine verminderte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α , TNF- β und IL-6 (Pratt & McPherson 1997). Ein weiterer Hinweis auf die protektive Funktion von TGF- β ist die Tatsache, daß Patienten mit multipler Sklerose eine weitere Erhöhung der Serumkonzentrationen von TGF- β unter erfolgreicher Therapie mit Interferon- β aufwiesen (Nicoletti et al. 1998). Im Gegensatz dazu stehen Studien, die nach Beeinflussung von Zytokinen wie IFN- γ oder TNF- α keinen Effekt auf den klinischen Verlauf der MS feststellen konnten (Antel 1999). Dennoch scheint die Modulation von Zytokinen ein erfolgversprechender Ansatz in der Therapie der MS zu sein, denn die gentechnische Ausschaltung des TNF- α -Rezeptors oder von TNF- α selbst kann die Apoptose von T-Lymphozyten vermindern, so daß die Aktivierung dieser Signalkaskade eine Verminderung der im Gehirn aktiven Lymphozyten bewirken könnte (Bachmann et al. 1999).

Auch bei Erkrankungen, bei denen der inflammatorische Einfluß auf das Krankheitsgeschehen nicht oder nur sekundär angenommen werden können, spielt das Zytokinnetzwerk in Zusammenhang mit Mikrogliazellen eine Rolle. So werden die Prionenkrankheiten, deren bekannteste Vertreter die spongiforme Enzephalopathie (BSE) und die Creutzfeld-Jakob-Krankheit sind, von Glykoproteinen (wie z.B. PrP^{Sc}) verursacht, in welche das physiologischerweise in Neuronen vorhandene Protein PrP^c umgewandelt wird. Ob die Krankheit durch den Verlust der nicht bekannten Funktion von PrP^c oder durch pathophysiologische Vorgänge der Mutante PrP^{Sc} ausgelöst wird, ist noch nicht hinreichend geklärt. Gewiß ist jedoch, daß man neuronale Schädigungen durch das deviante Glykoprotein nicht allein, jedoch in Kokultur mit Mikrogliazellen auslösen kann (Brown & Kretzschmar 1997). Ebenso sicher ist auch, daß sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- α , IL-6 und TGF- β erhöhte mRNA-Niveaus aufweisen. Besonders auffällig ist dabei, daß erhöhte Konzentrationen von TGF- β kolokalisiert sind mit den Prionproteinablagerungen (Baker et al. 1999).

Ablagerungen eines Proteins (β -Amyloid), das aus dem amyloid precursor protein (APP) gebildet wird, spielen auch bei der senilen Demenz vom Alzheimerstyp eine Rolle. Dieses β -Amyloid wird über einen Rezeptor aufgenommen und kann von den Mikrogliazellen nicht degradiert werden. Für eine Reihe von immunologischen Markern wie MHC Klasse II, Fc γ -Rezeptoren und Integrine wurde eine Hochregulation nach Exposition der Mikroglia mit β -Amyloid nachgewiesen. Auch Zytokine wie IL-1 und TNF- α werden verstärkt gebildet (González-Scarano & Baltuch 1999). Weitere Beobachtungen stützen die These, daß TGF- β eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Krankheit spielt. TGF- β war im Serum und im Liquor cerebrospinalis von Alzheimerpatienten erhöht (Chao et al. 1995c). Mikroglia und Astrozyten haben bei Alzheimerpatienten eine erhöhte Konzentration von TGF- β 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Flanders et al. 1998). Im tierexperimentellen Modell mit einer Überexpression von TGF- β konnte sowohl eine vermehrte Ablagerung von β -Amyloid (Flanders et al. 1998) als auch eine verstärkte Produktion des Vorläuferproteins APP in Astrozyten festgestellt werden (Mattson et al. 1997). Der zeitliche Verlauf dieser Erscheinungen läßt die Vermutung zu, daß es sich bei der Amyloidablagerung um einen sekundären Prozeß in Bezug auf ein noch nicht erkanntes Agens handelt. Interessanterweise wurde zumindest *in vitro* gezeigt, daß TGF- β einen protektiven Effekt auf die neuronale Schädigung durch β -Amyloid hat.

Bei ischämischen Schädigungen richtet sich die Aufmerksamkeit mittlerweile verstärkt darauf, die Vorgänge in der Penumbra besser zu verstehen, um daraus therapeutische Implikationen ableiten zu können. Ein wesentlicher Faktor für die Ausbildung der Penumbra-Entzündung ist die Rekrutierung peripherer Makrophagen. Diese wandern, durch astrozytäre Zytokine angelockt, in das ischämische Gebiet mit einer zeitlichen Verzögerung von drei bis sechs Tagen ein (Schroeter et al. 1997). Es kann als gesichert angesehen werden, daß Zytokine einen entscheidenden Einfluß auf die Größe der Penumbra und das Ausmaß des letztendlich nekrotischen Gebietes haben. Astrozyten von gentechnisch veränderten Mäusen, bei denen der TNF- α -Rezeptor nicht exprimiert wird, zeigten nach transientscher Ischämie keine Auffälligkeiten. Mikrogliazellen dieser Tiere waren im Vergleich zu Kontrolltieren weniger aktiviert, dafür war die neuronale Schädigung deutlich weiter ausgedehnt (Stoll & Jander 1999). Die Expression von mRNA für TGF- β , insbesondere von dem sonst in adulten Gehirnen kaum vorhandenen TGF- β 1, zeigt im ischämischen Areal nach transientscher Ischämie einen deutlichen Anstieg, der sein Maximum zu dem Zeitpunkt hat, wenn die Makrophagen beginnen einzuwandern. Die protektive Funktion dieses Anstiegs an TGF- β zeigte sich in Experimenten, in denen sich nach Behandlung

mit TGF- β vor der Ischämie eine Verkleinerung des nekrotischen Gebietes und eine Verminderung der Astroglialnarbe zeigte (Kriegelstein et al. 1995). Der therapeutische Nutzen dieser Erkenntnisse bedarf noch einer Evaluation.

Als Ursache von Erkrankungen wurden auch - meist genetisch bedingte - Defekte an Proteinen, die Ionenkanäle oder membranständige Enzyme sind, beschrieben. Ein Beispiel ist die chronische Granulomatose; Patienten mit dieser Erkrankung können ein Teilprotein der NADPH-Oxidase (bei der X-chromosomal vererbten Form das membranständige Protein gp91^{phox}) nicht synthetisieren. Dadurch können keine Sauerstoffradikale produziert werden, und der mit der NADPH-Oxidase verbundene Protonenkanal ist nicht aktivierbar (Bánfi et al. 1999). Da ein Hauptteil der unspezifischen Abwehr, wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, von der bakteriziden Wirkung der in Mikroglia- und anderen Immunzellen stattfindenden Produktion von Sauerstoffradikalen geleistet wird, ist die Folge einer chronischen Granulomatose eine Immunschwäche, die sich klinisch in häufigen Infektionen, meist verursacht durch *Staphylokokkus aureus* und gramnegative Bakterien, an verschiedenen Organsystemen manifestiert.

1.4 Ionenkanäle in Mikrogliazellen

Ionenkanäle haben, neben anderen Transportmechanismen über die Zellmembran, demzufolge eine Auswirkung auf die Immunantwort, was *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde. Es ist deshalb für das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Gehirn notwendig, die Ionenkanäle der Mikroglia und ihre Funktionen für diese Zellen zu untersuchen.

Man kann Ionenkanäle nach verschiedenen Gesichtspunkten klassifizieren: nach der Art des Stimulus, auf den sich die Kanäle öffnen, nach der Art der Ionen, die durch den Kanal hindurchgelassen werden, oder nach kinetischen Gesichtspunkten. In Mikrogliazellen wurden mittels elektrophysiologischer Methoden bisher Ionenkanäle beschrieben, die selektiv K^+ , H^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Cl^- leiten können. Einige Eigenschaften dieser Kanäle sind in Tabelle 1 (siehe Seite 22) aufgeführt. Aufgrund der vermuteten Herkunft der Mikrogliazellen ist es nicht verwunderlich, daß zumindest die Kanaltypen zu einem Hauptanteil mit denen der Makrophagen/Monozyten übereinstimmen.

Ein Großteil der veröffentlichten Arbeiten hat sich mit der Analyse von Kaliumkanälen beschäftigt. An spannungsaktivierten Kaliumkanälen wurden einwärts gleichrichtende, auswärts gleichrichtende und HERG-ähnliche K^+ -Kanäle beschrieben.

Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle wurden unter *in vitro* Bedingungen in verschiedenen Spezies, in Hirnschnittpräparaten sowie in Zelllinien wie der BV-2 nachgewiesen. Wie es für einwärts gleichrichtende Kanäle typisch ist, erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit mit zunehmender Hyperpolarisation. Das Schwellen- sowie das Umkehrpotential wird mit der Erhöhung der extrazellulären sowie der Verringerung der intrazellulären Kaliumkonzentration zu positiveren Werten verschoben. Zur Zeit ist für mikrogliale einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle kein spezifischer Inhibitor bekannt; an Kationen, die im mikromolaren Bereich eine Blockade hervorrufen können, stehen Barium und Cäsium zur Verfügung, die den Nachteil haben auch andere Kanäle zu beeinflussen (Nörenberg et al. 1994). Wenn man die Eigenschaften des einwärts gleichrichtenden Kaliumkanals betrachtet, so ähnelt er am ehesten dem Kanal Kir2.1, der von Mausmakrophagen kloniert wurde. Es besteht in der Literatur Einigkeit darüber, daß diese einwärts gleichrichtenden Kanäle an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials entscheidend beteiligt sind (Visentin et al. 1995).

HERG-ähnliche Kaliumkanäle wurden bisher nur an einer Zelllinie von Rattenmikroglia nachgewiesen. Dieser Kanaltyp erinnert aufgrund seines Strombildes stark an einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle, weist im Gegensatz zu diesen jedoch eine ausgesprochen rapide Inaktivierung auf. Das pharmakologische Profil mit einer relativen Insensitivität gegenüber Ba^{2+} und Cs^+ , jedoch einer Blockierbarkeit durch E-4031 in mikromolarer Konzentration, weisen ebenfalls auf einen deutlich anderen Kanaltyp hin (Zhou et al. 1998). Da der bisherige Nachweis nur in einer Zelllinie gelungen ist und unter physiologischen Ionenkonzentrationen die Stromamplituden sehr gering sind, ist die physiologische Bedeutung dieser Kanäle stark anzuzweifeln. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß ähnliche Kanäle an Proliferationsprozessen maligner Gewebe beteiligt sind, so daß HERG-ähnliche Kanäle vielleicht eine pathophysiologische Bedeutung haben.

Auswärts gleichrichtende Kaliumkanäle konnten *in vitro* an Zellkulturmodellen verschiedener Spezies, in Hirnschnittpräparaten und in Zelllinien nachgewiesen werden. Das Schwellenpotential liegt bei etwa -40 mV. Die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle erhöht sich mit zunehmender Depolarisation, wobei sich damit auch die Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung des Kanals verringern. Neben der zeitabhängigen Inaktivierung, die einer N-Typ Inaktivierung entspricht, ist eine C-Typ Inaktivierung zu beobachten, die sich in einer Abnahme der Stromamplitude bei repetitiver Depolarisation zeigt (Nörenberg et al. 1994). Aufgrund der kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften ist der in Mikrogliazellen nachgewiesene Kanal dem klonierten Kanal Kv1.3 am ähnlichsten. Die Auswärtsströme in Mikrogliazellen

können durch Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Nörenberg et al. 1994), durch Aktivierung der Proteinkinase C (Visentin & Levi 1997) oder durch Modifikation des extra- beziehungsweise intrazellulären pH-Wertes (Eder & Heinemann 1996) direkt moduliert werden. Die zu diesen Phänomenen veröffentlichten Ergebnisse sind in sich nicht konsistent, vermutlich spielen unterschiedliche Versuchsbedingungen eine Rolle für die unterschiedlichen Resultate. Das Expressionsniveau der auswärts gleichrichtenden Kaliumkanäle wird durch eine Reihe von Zytokinen beeinflusst. Durch proinflammatorische Stoffe wie IFN- γ (Nörenberg et al. 1992), GM-CSF (Eder et al. 1995) oder Zellwandbestandteile grampositiver (Draheim et al. 1999) beziehungsweise gramnegativer Bakterien (LPS, Nörenberg et al. 1994) kann in Mikrogliazellen eine vermehrte Expression dieser Ionenkanäle induziert werden. Die funktionelle Bedeutung dieser Kanäle muß für Mikrogliazellen noch nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise aus anderen Zelltypen, daß diese Ionenkanäle an der Aufrechterhaltung eines negativen Membranpotentials nach Depolarisation (Nörenberg et al. 1992), an der Proliferation (DeCoursey et al. 1984) und an der Volumenregulation (Deutsch & Chen 1993) von Immunzellen beteiligt sind.

Kalziumabhängige Kaliumkanäle wurden in Mikrogliazellen verschiedener Spezies als spannungsunabhängige und -abhängige Kanaltypen beschrieben. Die beiden Kanäle unterscheiden sich neben der Spannungssensitivität auch im pharmakologischen Profil und in der Einzelkanalleitfähigkeit. Der spannungsunabhängige Kanaltyp (Eder et al. 1997) ähnelt am stärksten dem klonierten Kanal hSK4 (Joiner et al. 1997), während der spannungsabhängige Typ (McLarnon et al. 1997) dem zuerst aus *Drosophila* klonierten Slo Kanal zu entsprechen scheint (Adelman et al. 1992). Vermutlich werden beide Kanaltypen in Mikrogliazellen exprimiert, Untersuchungen zur Funktion und Regulation dieser Kanäle stehen noch aus.

Eine weitere Klasse von Kaliumkanälen, die durch intrazelluläre Liganden aktiviert werden, sind die für Pertussistoxin sensitiven G-Protein-aktivierten Kaliumkanäle (Ilschner et al. 1996). Sie sind durch Zugabe von nicht hydrolisierbarem Guanosintriphosphat (GTP) aktivierbar, als physiologische Stimuli kommen Adenosintriphosphat (ATP), Komplementfaktor C5a und TNF- α in Betracht, die *in vitro* diese Kaliumkanäle in Mikroglia aktivieren konnten. Die physiologische oder pathophysiologische Bedeutung der G-Protein-aktivierten Kaliumkanäle bedarf noch weiterer Forschung.

Spannungsabhängige Protonenkanäle spielen, wie in Kapitel 1.1 und 1.3 bereits erläutert wurde, eine wichtige Rolle für das Aufrechterhalten der Homöostase der Mikrogliazellen während des respiratorischen Bursts, bei dem die freien Sauerstoffradikale gebildet werden. Zur Zeit ist in

Mikrogliazellen nur der „klassische“ Protonenkanal nachgewiesen worden. Er ist in seinen kinetischen Eigenschaften stark vom pH-Gradienten über der Zellmembran abhängig. Bei einem pH-Unterschied von 1,5 aktiviert der H^+ -Kanal ab einem Schwellenpotential von -40 mV mit einer langsamen Aktivierungskinetik; Erhöhung des extrazellulären beziehungsweise Verringerung des intrazellulären pH-Wertes führt zu einer Verschiebung des Schwellenpotentials sowie der g-V-Kurve zu negativeren Potentialen. Zur Inhibition dieses H^+ -Kanals stehen nur polyvalente Kationen (Zn^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} , Ni^{2+} und andere) zur Verfügung, die ihre Wirkung bereits im mikromolaren Bereich entfalten (Klee et al. 1999). Vermutlich gibt es in Mikroglia neben diesem Protonenkanal noch einen weiteren Typ, wie er in Eosinophilen beschrieben wurde (Bánfi et al. 1999). Funktionell dient der Protonenkanal, zumindest in Neutrophilen, zur Extrusion der während des respiratorischen Bursts anfallenden sauren Valenzen, die auf diese Weise ohne Energieverbrauch aus dem Intrazellulärraum verschoben werden können. Potenziert werden kann die Leistung der Protonenkanäle durch Arachidonsäure, welche die Ströme durch spannungsaktivierte Protonenkanäle verstärkt (DeCoursey & Cherny 1993). Da Arachidonsäure ein Inflammediator ist, scheint dieser Effekt pathophysiologisch sinnvoll zu sein.

Spannungsaktivierte Natriumkanäle, die sensitiv gegenüber Tetrodotoxin waren, wurden in Mikroglia des Menschen und der Ratten nachgewiesen. In Ganzzellableitungen konnten die Ströme ab einem Schwellenpotential von -40 mV ausgelöst werden und zeichneten sich durch eine äußerst schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik aus. In einer Studie konnte ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Na^+ -Kanäle und dem Ramifikationsprozeß der Mikroglia hergestellt werden (Schmidtmayer et al. 1994). Ein direkter Einfluß auf den Ramifikationsprozeß ist jedoch entweder nicht gegeben oder die Funktion der Natriumkanäle kann durch andere Mechanismen kompensiert werden, da eine Kanalinhibition mit Tetrodotoxin die Ramifizierung der Mikroglia nicht verhindern konnte (Eder et al. 1998).

Zwei Arten von Kalziumkanälen wurden in Mikroglia beschrieben. Spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle ähneln sehr dem L-Typ; sie können durch BAY K 8644 geöffnet und durch Nifedipin und Verapamil blockiert werden. Ein sehr ausgeprägtes Rundown-Phänomen kennzeichnet diese Kanäle (Colton et al. 1994). Eine anderer Typ von Kalziumkanälen, der nach Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher öffnet, sind die CRAC-Kanäle (calcium release-activated calcium channel). Dieser im Sekundenbereich aktivierende Kanaltyp wurde sowohl mit der Patch-Clamp-Technik als auch mit Imagingmethoden nachgewiesen (Nörenberg et al. 1997, Möller et al. 1997). Eine genauere Charakterisierung der Eigenschaften dieses Kanals muß in Mikroglia noch erfolgen. Eine Modulation der Sauerstoffradikalproduktion konnte durch Beein-

flussung der spannungsaktivierten Kalziumkanäle nachgewiesen (Colton et al. 1994), eine Funktion für CRAC-Kanäle noch nicht verifiziert werden.

In der Literatur wurden bisher zwei Arten von Chloridkanälen in Mikroglia verschiedener Spezies erwähnt. Spannungsabhängige Chloridkanäle scheinen in der Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-Technik nicht nachweisbar zu sein, werden jedoch im "excised patch", bei dem für die Messung ein kleines Stück aus der Zellmembran herausgerissen wird, aktiviert. Sie unterscheiden sich in ihren Eigenschaften nicht von den in Makrophagen beschriebenen Chloridkanälen: die Einzelkanalleitfähigkeit beträgt um die 300 pS; sie inaktivieren langsam, wobei mit steigender Depolarisation die Inaktivierung schneller wird; die Aktivierung des Kanals scheint unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration zu sein (McLarnon et al. 1997). Ein spannungsunabhängiger Chloridkanal wurde in Mikrogliazellen nachgewiesen. Dieser Kanal ist durch Dehnung der Zellmembran, wie es zum Beispiel durch hypoosmotische Zellvolumenzunahme hervorgerufen wird, aktivierbar. Der dehnungsaktivierte Kanal weist eine Auswärts-rectifizierung auf, zeigt keine zeit- oder spannungsabhängigen Änderungen in der Aktivierung oder Inaktivierung und weist ein ausgedehntes Rundown-Phänomen auf, das durch Erschöpfung der intrazellulären ATP-Reserven hervorgerufen wird (Eder et al. 1998). Der dehnungsaktivierte Typ der Chloridkanäle ist an der Proliferation (Schlichter et al. 1996) und der Ramifizierung (Eder et al. 1998) von Mikrogliazellen beteiligt.

Es gibt bisher wenig Hinweise darauf, daß extrazelluläre Liganden eine Rolle bei der Aktivierung von Kanälen in Mikrogliazellen spielen. Eine Ausnahme bildet die Klasse der ATP-aktivierten Kanäle, die an Mikrogliazellen über mindestens zwei der bisher bekannten ATP-Rezeptoren eine Kanalöffnung bewirken können (Visentin et al. 1999). Es wurden sowohl ionotrope Rezeptoren (P2X) als auch metabotrope (P2Y) Rezeptoren nachgewiesen; während die erstgenannten einen Kalziumeinstrom und eine schnelle Depolarisation bewirken, werden nach Bindung an die metabotropen Rezeptoren die intrazellulären Kalziumspeicher entleert und ein Kaliumauswärtsstrom langsam aktiviert. Die funktionelle Relevanz dieser Kanäle liegt vermutlich in der Auslösung von apoptotischen Vorgängen, der Förderung der Freisetzung von Interleukin-1 sowie in der Unterstützung der Bildung vielkerniger Riesenzellen (Di Virgilio et al. 1999).

Es wird durch diese Aufzählung deutlich, daß in der Zellmembran von Mikrogliazellen eine Reihe von funktionellen Ionenkanälen nachweisbar sind. Die Expression der Kanäle variiert im Laufe der Ontogenese und mit den verschiedenen Aktivierungszuständen, was auf eine spezifische, aber häufig noch unbekannte, Funktion hinweist.

Kanaltyp (Einzelkanal-leitfähigkeit)	Spezies (Präparation)	Pharmakologie (Bereich der IC_{50})
Einwärts rektifizierender K^+ -Kanal (≈ 30 pS)	Ratte (Zellkultur); Maus (Zellkultur, Hirnschnitt, BV-2 Zelllinie); Bovin (Kultur); Human (Kultur)	Ba^{2+} (μM); Cs^+ (μM); TEA^+ (mM); Quinine (mM); Na^+ (mM)
HERG ähnliche K^+ Kanäle	Ratte (MLS-9 Zelllinie)	E-4031 (μM); Cs^+ (mM); Ba^{2+} (mM)
Auswärts rektifizierender K^+ Kanal (≈ 12 pS)	Ratte (Zellkultur); Maus (Zellkultur); Human (Zellkultur)	CTX (nM); KTX (nM); NTX (nM); MTX (nM); 4-AP (mM); Cd^{2+} (μM); Zn^{2+} (μM); Ba^{2+} (mM); TEA^+ (mM)
Spannungsabhängige Ca^{2+} -aktivierte K^+ Kanäle (>200 pS)	Bovin (Zellkultur); Human (Zellkultur)	TEA^+ (μM)
Spannungsunabhängige Ca^{2+} -aktivierte K^+ Kanäle	Maus (Zellkultur)	CTX (nM), La^{3+} (μM -mM), Ba^{2+} (μM -mM), Cd^{2+} (mM), TEA^+ (mM)
G-protein-aktivierte K^+ Kanäle	Maus (Zellkultur)	4-AP (mM), TEA^+ (mM)
H^+ Kanäle	Maus (Zellkultur); Ratte (Zellkultur); Human (Zellkultur)	Zn^{2+} (μM), La^{3+} (μM), Ni^{2+} (μM), Cd^{2+} (μM), Co^{2+} (μM), Ba^{2+} (mM), 4-AP (mM), TEA^+ (mM)
Na^+ Kanäle	Ratte (Zellkultur, Kokultur mit Astrozyten); Human (Zellkultur)	TTX (nM)
Spannungsaktivierte Ca^{2+} Kanäle	Ratte (Zellkultur)	
Ca^{2+} -freisetzungsaktivierte Ca^{2+} Kanäle	Ratte (Zellkultur)	
Spannungsabhängige Cl^- Kanäle (280-325 pS)	Bovin (Zellkultur); Human (Zellkultur)	Ba^{2+} (mM)
Spannungsunabhängige dehnungsaktivierte Cl^- Kanäle	Ratte (Zellkultur); Maus (Zellkultur \pm ACM)	DIDS (μM), SITS (μM), NPPB (μM), IAA-94 (μM), Flu-fenaminsäure (μM)

Tabelle 1

Ionenkanäle in Mikrogliazellen (nach Eder 1998)

IC_{50} : halbmaximale Inhibition des Stromes; NTX: Noxiustoxin; MTX: Margatoxin; TEA^+ : Tetraethylammonium; 4-AP: 4-Aminopyridin; TTX: Tetrodotoxin; DIDS: 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonsäure; SITS: 4-acetamino-4'-isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonsäure; NPPB: 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure; IAA-94, 6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-2-methyl-1-oxo-1H-inden-5-yl(oxy)essigsäure

1.5 Fragestellung dieser Dissertation

Die Deaktivierung von Mikrogliazellen ist ein Prozeß, der für den Erhalt der Hirnfunktionen von entscheidender Bedeutung ist. Physiologisch relevant ist die Beeinflussung der im Rahmen des natürlichen Umsatzes einwandernden Makrophagen. Von pathophysiologischem Interesse sind die Deaktivierung der Mikrogliazellen nach dem Abklingen von krankhaften Ereignissen sowie die unzulängliche Deaktivierung bei ischämischen und chronisch degenerativen Hirnerkrankungen, die zu einer Ausweitung der neuronalen Schädigung führen kann.

An isolierter Mikroglia wurden bisher vorrangig die Aktivierungsprozesse unter dem Einfluß von LPS oder von aktivierenden Zytokinen wie TNF- α und IFN- γ untersucht. Kultivierte Mikroglia befindet sich bereits in einem aktivierten Zustand, der durch die amöboide Morphologie, einen hohen Spiegel der Zytokinfreisetzung und eine ausgeprägten Expression verschiedener Oberflächenantigene gekennzeichnet ist. Es ergab sich deshalb die Notwendigkeit, ein Zellkulturmodell zu etablieren, welches eine Untersuchung an isolierter deaktivierter Mikroglia ermöglichte.

Astrozyten scheinen eine entscheidende Rolle bei der Deaktivierung der Mikrogliazellen zu spielen. Sie beeinflussen die Mikrogliafunktionen wie die Phagozytose oder die Zytokinproduktion, die Expression der Oberflächenantigene, die Morphologie der Mikrogliazellen sowie die Expression von Ionenkanälen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Zytokine, die von Astrozyten freigesetzt werden können, die Deaktivierung isolierter Mikrogliazellen bewirken.

Da bei deaktivierter Mikroglia in dem hier vorgestellten Zellkulturmodell auch eine transiente Hochregulation eines Kaliumauswärtsstromes beobachtet wurde, war die Identifikation der dafür verantwortlichen astrozytären Faktoren ein weiteres Ziel der Arbeit. Durch eine ausführliche Charakterisierung wurde der hochregulierte Kaliumkanaltyp bestimmt und dadurch ein Vergleich mit dem Kaliumkanal ermöglicht, der bei aktivierenden Stimuli wie LPS oder IFN- γ vermehrt exprimiert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung von Mikrogliazellkulturen

2.1.1 Präparation der Primär- und Sekundärkulturen

Zum Anlegen der primären Zellkulturen wurde von neonatalen NMRI-Mäusen (P2-P4) (geliefert von Charles River, Sulzfeld, Deutschland) ein Gemisch verschiedener Gehirnzellen analog zu der von Frei und Mitarbeitern beschriebenen Methode (Frei et al. 1987) gewonnen.

Dazu wurden die beiden Großhirnhemisphären der Mäuse vom Hirnstamm abgesetzt und der Hippokampus sowie die Pachymeninx entfernt. Danach wurde das restliche Gewebe zerkleinert, für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei das Medium (Hank's balanced salt solution, HBSS) 0,125 % Trypsin enthielt. Nach der enzymatischen Lyse wurden die Gewebestücke mit feuerpolierten Pasteurpipetten mechanisch unter Zusatz von 200 U Desoxyribonuklease (DNase) trituriert, so daß am Ende eine Einzelzellsuspension vorlag. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von $2-4 \times 10^6$ Zellen pro 10 ml Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) in Kulturflaschen eingebracht. Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (M-CSF) wurde als exogener Wachstumsfaktor dem Kulturmedium (DMEM) in Form von 30 % L929-Fibroblastenkulturüberstand hinzugefügt; ebenfalls wurde 10 % fötales Kälberserum (FCS), Glutamin sowie Penicillin/Streptomycin dem Medium beigegeben. Das Kulturmedium wurde in der ersten Woche zweimal erneuert.

Nach etwa 10-14-tägiger Kultivierung auf einer stark adhärenenten Astrozytenzellschicht wurden die darauf locker aufsitzenden Mikrogliazellen gewonnen. Dazu wurden die Kulturflaschen für eine halbe Stunde bei 300 rpm auf einem Schüttler bewegt, um die Mikroglia vom Astrozytenrasen abzulösen. Die im DMEM schwimmenden Mikrogliazellen wurden zentrifugiert, in neuem Medium resuspendiert und anschließend in Sekundärkultur gebracht. Dazu wurden 3×10^4 Zellen auf unbeschichtete Glasplättchen pipettiert, die in 24-well-Platten in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt wurden. An diesen isolierten, an den Glasplättchen adhärenenten Mikrogliazellen wurden die elektrophysiologischen, morphologischen und immunologischen Untersuchungen nach ein bis sieben Tagen durchgeführt.

2.1.2 Behandlung der Mikrogliazelllinie BV-2

Um die Anzahl der zu tötenden Tiere gering zu halten, wurde ein Teil der elektrophysiologischen Experimente mit der Mikrogliazelllinie BV-2 durchgeführt. Diese Zelllinie wurde, wie in der

Originalarbeit (Blasi et al. 1990) beschrieben, durch eine stabile Transfektion von Mikrogliazellen mit einem Retrovirus hergestellt. Die so gewonnene immortalisierte Zelllinie zeigte sowohl bei den Untersuchungen der italienischen Arbeitsgruppe um Blasi als auch bei den im Rahmen der hier vorgestellten Experimenten keine wesentlichen Unterschiede in den morphologischen, phänotypischen und funktionellen Charakteristika.

Die adhärennten Zellen wurden analog zur murinen Mikroglia-primärkultur in DMEM, das mit 10 % FCS versetzt wurde, im Inkubator aufbewahrt. Einmal wöchentlich wurden die Zellen in neue Kulturflaschen überführt. Dazu wurde die BV-2 zweimal mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gespült, dann in PBS mit 0,125 % Trypsin für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die dadurch abgelösten Zellen wurden mit 600 rpm bei 37 °C für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und je 2×10^6 Zellen wurden in 20 ml DMEM weiter kultiviert. Ebenfalls aus diesem Zentrifugationsrückstand wurden die Zellen gewonnen, die, wie bei der Herstellung der sekundären Mikroglia-kulturen, auf Glasplättchen in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen pro 500 µl DMEM pipettiert wurden. Nach einem Zeitraum von ein bis vier Tagen wurden die elektrophysiologischen Messungen an den BV-2-Zellen durchgeführt.

2.1.3 Behandlung der Mikrogliazellkulturen mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) und Zytokinen

Um die Frage beantworten zu können, ob und wie lösliche astrozytäre Faktoren Mikrogliazellen beeinflussen, war es notwendig Astrozyten-konditioniertes Medium (ACM) zu gewinnen. Dazu wurden die bei der Präparation der Mikroglia-sekundärkultur zurückbleibenden Kulturflaschen, in denen sich ein dichter Astrozytenrasen befand, mit DMEM und 2 % FCS aufgefüllt. Das Kulturmedium wurde zweimal pro Woche ausgetauscht, zur Reinigung von Zellbestandteilen mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert und bis zur experimentellen Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

Ein Teil der Experimente wurde mit verschiedenen Zytokinen (TGF-β1, TGF-β2, M-CSF, GM-CSF) sowie Antikörpern (anti-pan-TGF-β, anti-M-CSF, anti-GM-CSF) durchgeführt. Dazu wurden diese Stoffe als Stammlösung in einer Konzentration von 10 ng/µl (Zytokine) bzw. 1 µg/µl (Antikörper) in DMEM angesetzt und bei -80 °C bis kurz vor der experimentellen Anwendung gelagert. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Zytokine in DMEM und die Antikörper in ACM etwa eine halbe Stunde präinkubiert.

Das ACM und die Zytokine wurden, wenn es nicht anders erwähnt ist, auf die Mikrogliazellen 24 Stunden vor Durchführung der Messungen gegeben.

2.2 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die Messungen der spannungsabhängigen Kaliumströme der Mikrogliazellen erfolgte mit Hilfe der Patch-clamp-Technik in der Ganzzellkonfiguration (Hamill et al. 1981). Mit dieser Methode ist es möglich, Ionenbewegungen durch intramembranäre Kanäle zu registrieren und deren Abhängigkeit von der Potentialdifferenz, die über der Zellmembran anliegt, sowie vom Konzentrationsgradienten der entsprechenden Ionen zu untersuchen.

Das Prinzip der Patch-clamp-Technik besteht darin, daß im Sinne einer Spannungsklemme die Spannung über der Zellmembran auf ein definiertes Niveau gebracht wird und der zur Aufrechterhaltung dieses Potentials notwendige Strom gemessen wird. Im Idealfall wird dieser registrierte Strom nur von der durch die geöffneten Kanäle verschobenen ionalen Ladung Q bestimmt, wie es der physikalischen Definition laut Gleichung 1 entspricht. Der Öffnungsmechanismus dieser Kanäle ist für Messungen mittels Patch-clamp-Technik nicht ausschlaggebend, prinzipiell können sowohl spannungs-, kalzium-, dehnungs- als auch transmitteraktivierte Ströme gemessen werden.

$$I = \frac{dQ}{dt}$$

Gleichung 1 allgemeine Formel zur Bestimmung des elektrischen Stromflusses

Zur Messung der Ganzzellströme wurde das intrazelluläre Milieu über die Pipettenlösung und eine Elektrode an den invertierenden Eingang eines über einen Strom-Spannungs-Wandler negativ rückgekoppelten Operationsverstärker angeschlossen. Dieser führt das Pipettenpotential einem an den nicht-invertierenden Eingang angelegten Referenzpotential nach. Der dabei über den Rückkopplungswiderstand gegebene Strom wird gemessen.

Auf systematische Fehler, die diese Messung verfälschen können, und deren Verhinderung wird in Kapitel 2.2.6 eingegangen.

2.2.1 Anfertigung der Patchpipetten

Die Herstellung der Patchpipetten erfolgte aus dünnwandigem Borosilikatglasröhrchen (Hilgenberg, Malsfeld), welche einen Außendurchmesser von 1,5 mm und einen Innendurchmesser von 1,0 mm aufwiesen. Mit einem vertikalen Elektrodenziehgerät (Narishige PP-83, Tokio, Japan)

wurden die Pipetten in einem zweistufigen Verfahren gezogen und bei Bedarf unter mikroskopischer Kontrolle feuerpoliert. Die so erzeugten Patchpipetten hatten einen Innendurchmesser von 1-2 μm , was nach Füllung mit der intrazellulären Lösung Lint einem Widerstand zwischen 3 und 5 $\text{M}\Omega$ entsprach.

2.2.2 Durchführung der Patch-clamp-Messungen

Als Referenz- bzw. Meßelektroden dienten Silber/Silberchlorid-Elektroden, die sich in der extra- bzw. intrazellulären Lösung befanden. Die Patchpipette befand sich in einem Elektrodenhalter, der mittels eines hydraulischen Mikromanipulators bewegt werden konnte.

Durch Erzeugen eines leichten Überdrucks während des Eintauchens der Patchpipette in die extrazelluläre Lösung wurde ein kontinuierlicher Fluß aus der Patchpipette erreicht und dadurch deren Spitze von Verunreinigungen freigehalten. Nachdem der Kontakt zwischen Pipettenspitze und Zelloberfläche hergestellt war, wurde ein leichter Unterdruck über die Patchpipette appliziert. Dadurch wurde ein Abdichtwiderstand von mehr als 10 $\text{G}\Omega$ zwischen der Glaswand der Pipettenspitze und der Zellmembran erreicht, d.h. es bildete sich ein sogenannter "Gigaseal". Dadurch konnten nahezu keine Ladungen mehr an der Verbindungsstelle Pipette/Zelle gegen die Erdung abfließen, was eine Verfälschung der Meßergebnisse zur Folge hätte. Im Anschluß an die Ausbildung des Gigaseals wurde durch einen kurzzeitigen, starken Unterdruck das Membranstück unter der Pipettenöffnung durchbrochen und damit die sogenannte "Ganzzellkonfiguration" erreicht. Verifiziert wurde das Erreichen der Ganzzellkonfiguration durch eine Zunahme der kapazitiven Umladeströme bei den repetitiv applizierten Potentialsprüngen, die während des Sealvorganges zur Ermittlung des Abdichtwiderstandes erfolgten.

2.2.3 Extra- und intrazelluläre Lösungen

Die Zerstörung der Zellmembran unter der Pipette ermöglicht nicht nur einen niederohmigen elektrischen Zugang zur Zelle, sondern auch die Vermischung des intrazellulären Milieus mit genau definierten Lösungen in der Patchpipette. Aufgrund der Volumenverhältnisse zwischen der Zelle und der Patchpipette kann davon ausgegangen werden, daß das intrazelluläre Milieu exakt der verwendeten intrazellulären Lösung entspricht. Durch den Zusatz oder das Weglassen bestimmter Ionen in den extrazellulären Badlösungen und den intrazellulären Lösungen innerhalb der Patchpipetten können Ionenströme isoliert dargestellt und dadurch genauer analysiert werden.

Für die Kaliumstrommessungen wurde die folgende Pipettenlösung verwendet:

L_{int} :	KCl – 120 mM
	EGTA – 11 mM
	HEPES – 10 mM
	CaCl ₂ – 1 mM
	MgCl ₂ – 2 mM

Für diese Lösung wurde ein pH-Wert von 7,35 mittels KOH eingestellt.

Die auf Glasplättchen adhärenen Mikrogliazellen wurden unmittelbar vor Beginn der elektrophysiologischen Messungen aus dem Kulturmedium in die folgende extrazelluläre Badlösung überführt:

L_{exNa} :	NaCl – 130 mM
	KCl – 5 mM
	HEPES – 10 mM
	D-Glukose – 8 mM
	CaCl ₂ – 2 mM
	MgCl ₂ – 1 mM

Für die genaue Charakterisierung der Kaliumeinwärtsströme wurde zur Verhinderung eines Natriumblocks in einem Teil der Experimente eine extrazelluläre Lösung verwendet, die keine Natriumionen enthielt:

L_{exK} :	KCl – 120 mM
	HEPES – 10 mM
	D-Glukose – 8 mM
	CaCl ₂ – 2 mM
	MgCl ₂ – 1 mM

Der pH-Wert der extrazellulären Lösungen wurde mit NaOH (L_{exNa}) bzw. KOH (L_{exK}) auf 7,4 fixiert.

Zur Verhinderung der Öffnung von dehnungsaktivierten Kanälen wurden die Lösungen unter eventueller Zugabe von D-Glukose auf eine Osmolalität von 280 mosmol/kg eingestellt. Dies wurde mit einem kryoskopischen Osmometer verifiziert.

2.2.4 Pharmakologische Untersuchungen

Zur pharmakologischen Charakterisierung der spannungsabhängigen Kaliumströme der Mikrogliazellen wurde die Wirkung verschiedener Pharmaka untersucht. Diese wurden extrazellulär über eine Perfusionspipette appliziert, wie sie von Konnerth und Mitarbeitern (Konnerth et al. 1987) beschrieben wurde. Diese Pipette bestand aus vier bis sechs Zuläufen, die zu einer gemeinsamen Pipettenspitze mit einem Öffnungsdurchmesser von circa 100 µm zusammen-

geführt wurden, so daß der Perfusionsfluß auch bei verschiedenen applizierten Lösungen konstant blieb.

Die Pipette wurde mit Hilfe eines weiteren Mikromanipulators nach Erreichen der Ganzzellkonfiguration in einer Entfernung von etwa 50 µm zur untersuchten Zelle positioniert, so daß das extrazelluläre Milieu rasch und vollständig ausgewechselt werden konnte. Die Fließgeschwindigkeit der superfundierten Lösungen wurde über den hydrostatischen Druck reguliert.

Zur Beschreibung des spannungsabhängigen Kaliumeinwärtsstroms wurden die folgenden Pharmaka in die extrazelluläre Superfusionslösung eingebracht:

BaCl ₂	0,1-1 mM
δ-Dendrotoxin (δ-DTX)	100 nM

In einigen Untersuchungen wurde, wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben, das extrazelluläre Natrium durch Kalium substituiert.

Zur Untersuchung der spannungsabhängigen Kaliumauswärtsströme kamen die folgenden Toxine zum Einsatz:

Charybdotoxin (CTX)	1-100 nM
Kalioxin (KTX)	1-100 nM
α-Dendrotoxin (α-DTX)	10-100 nM

Die verwendeten Peptidtoxine (CTX, KTX, α- und δ-DTX) wurden in extrazellulärem Medium gelöst, welchem 0,1 % Albumin (bovines Serumalbumin; BSA) als Transportprotein zugesetzt wurde. Dadurch sollte verhindert werden, daß sich die Toxine an den Plastikelementen des Meß- und Superfusionssystems absetzen.

Zur Untersuchung des intrazellulären Signaltransduktionsweges von TGF-β wurden die folgenden Substanzen dem Kulturmedium (DMEM) 12 Stunden vor den Messungen zugefügt:

dibutyryl-cAMP (dBcAMP)	10-100 µM
Phorbolmyristatacetat (PMA)	10-100 nM

Die folgenden Proteinkinaseinhibitoren wurden jeweils eine halbe Stunde vor Zugabe von TGF-β und während der Zytokininkubation dem Kulturmedium beigegeben:

H7	100 µM
Proteinkinase A-Inhibitor (14-22)	10 µM
Proteinkinase C-Inhibitor (19-27)	10 µM
Genistein	200 µM
KN-93	10-20 µM

Die Peptide wurden in der myristoylierten Form verwendet, um eine erhöhte Zellpermeabilität zu erreichen.

2.2.5 Datenaufzeichnung und –analyse

Alle Ganzzellmessungen wurden mit einem EPC-9 (HEKA, Lambrecht/Pfalz), der einen Verstärker und ein Computerinterface enthält, bei Zimmertemperatur (20-23 °C) durchgeführt. Dieser Verstärker wurde über das Interface von einem IBM-kompatiblen Computer gesteuert, wodurch die Daten online digitalisiert und auf der Festplatte des Computers abgelegt werden konnten. Das Programm „Pulse-PulseFit“ (ebenfalls HEKA, Lambrecht/Pfalz) diente zur Kontrolle der Parameter des EPC-9, zur Datenaufzeichnung und zur Analyse der Daten. Zur Berechnung einiger Parameter wurden im Programm „IGOR“ (Wavemetrics, Lake Oswego/USA) selbstgeschriebene Fitfunktionen verwendet.

Für einige Daten wurde das arithmetische Mittel errechnet. Die Ergebnisse sind in der Form Mittelwert \pm S.E.M. dargestellt. Für die statistische Analyse und die grafische Darstellung wurden die Stromantworten für passive Leckleitfähigkeiten korrigiert. Zur Auswertung kamen nur solche Zellen, bei denen diese Leckströme sehr viel kleiner waren als die spannungs-aktivierten Ionenströme (siehe auch 2.2.6).

Um auszuschließen, daß eine Zunahme der Stromamplituden (I_M) nur durch eine Größenzunahme der Zellen bedingt war, wurden die Stromdichten (I_p) entsprechend Gleichung 2 ermittelt.

$$I_p = \frac{I_M}{C_M} \cdot C_{BioMem}$$

Gleichung 2 Bestimmung der Stromdichte

Dabei wurde von einer spezifischen Membrankapazität C_{BioMem} von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Cole 1949; Holevinsky & Nelson 1998) ausgegangen; die Stromdichte I_p wird ergo in der Einheit $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ angegeben. Die Abschätzung der Membrankapazität C_M wurde mit dem Abgleich für C_{slow} am EPC-9 vorgenommen. Konnte in einer Zelle kein entsprechender Strom nachgewiesen werden, so wurde I_p mit Null festgelegt.

Die Zeitkonstanten der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik wurden für den Kaliumauswärtsstrom nach dem Hodgkin-Huxley-Modell mit einer $n^{4,1}$ Kinetik berechnet (Hodgkin & Huxley 1952). Das mathematische Modell ist in der Gleichung 3 wiedergegeben. Dabei ist I_{total}

der gesamte Strom, $I_{K,max}$ der maximale Strom bei dem angelegten Potential, I_l die zeitunabhängigen Leakströme, τ_n und τ_j sind die Zeitkonstanten der Aktivierung bzw. Inaktivierung.

$$I_{total} = I_{K,max} (1 - e^{-\frac{t}{\tau_n}})^4 e^{-\frac{t}{\tau_j}} + I_l$$

Gleichung 3 mathematisches Äquivalent des Hodgkin-Huxley-Modells vom Typ n^4j^1

Für die Darstellung der spannungsabhängigen kinetischen Eigenschaften des auswärts gerichteten Kaliumstroms (I_{DR}) wurden die auf den Maximalwert normalisierten Leitfähigkeiten (für das Aktivierungsverhalten: $g_K/g_{K,max}$) bzw. Spitzenamplituden (für das Inaktivierungsverhalten: $I_K/I_{K,max}$) gegen die über der Zellmembran angelegte Potentialdifferenz aufgetragen. Die Leitfähigkeiten wurden hierzu entsprechend Gleichung 4 berechnet.

$$g_K = \frac{I}{E - E_K}$$

Gleichung 4 Berechnung der Kaliumleitfähigkeit g_K aus der gemessenen Spitzenamplitude I , dem Kaliumumkehrpotential E_K und dem angelegten Testpotential E

Anschließend wurden die Datenpunkte nach DeFelice 1997 entsprechend einer Boltzmannfunktion, wie sie in Gleichung 5 wiedergegeben ist, gefittet. Dabei beschreibt V das angelegte Testpotential, g_K die Leitfähigkeit bei einem Potential von V und $g_{K,max}$ die maximale Kaliumleitfähigkeit. Im nichtlinearen Fitprozeß werden die Variablen V_H und k ermittelt; die halbmaximale In-/Aktivierung der Leitfähigkeiten wird durch V_H repräsentiert, k ist ein in mV angegebenes Maß für die Steigung der Boltzmannfunktion im Punkt V_H . Für die Verwendung bei Kaliumauswärtsströmen, wie es in der vorliegenden Arbeit geschehen ist, folgt, daß für Aktivierungsprozesse $k > 0$ und für Inaktivierungsprozesse $k < 0$ sein muß.

$$\frac{g_K}{g_{K,max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_H - V}{k}}}$$

Gleichung 5 Boltzmannfunktion zur Beschreibung des Aktivierungs- und steady-state Inaktivierungsverhaltens

Um die statistische Signifikanz von Abweichungen zwischen unabhängig oder abhängig voneinander gewonnenen Daten zu überprüfen, wurde das Vorliegen einer Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest kontrolliert. Konnte dadurch eine Normalverteilung verifiziert werden, wurde Student's t-Test für unabhängige bzw. gepaarte Stichproben eingesetzt.

Im anderen Fall kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus wurde das Programm „SPSS“ (SPSS Inc., Chicago/USA) verwendet.

2.2.6 Systematische Fehler und deren Behebung

Da der EPC-9 Verstärker nur die Potentialdifferenz zwischen der angelegten Kommandospannung und der Referenzelektrode messen kann, ist es auch bei hinreichend gutem Seal für ein sauberes Extrahieren der spannungsaktivierten Stromantworten von essentieller Bedeutung, die übrigen störenden Komponenten zu kennen und deren Anteil so weit als möglich zu vermindern.

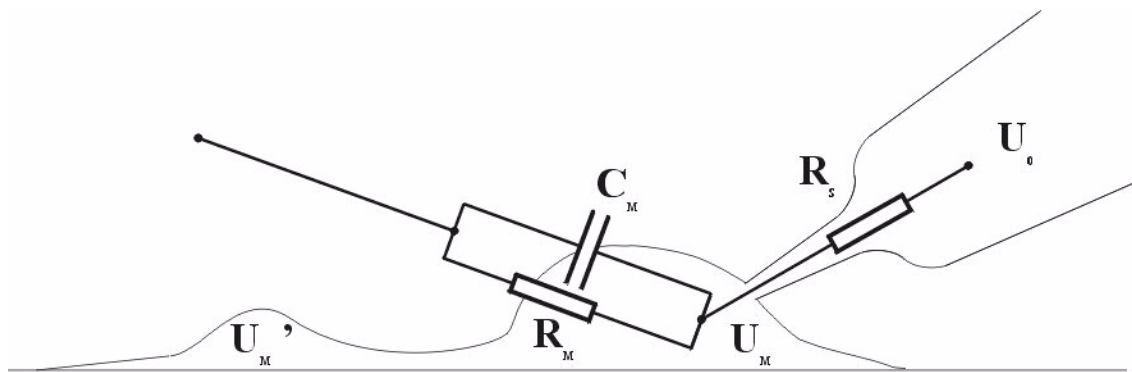


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Ganzzellkonfiguration mit elektrischem Ersatzschaltbild (nach Numberger & Draguhn 1996)

Die experimentelle Situation bei der Ganzzelleableitung ist in Abbildung 1 inklusive vereinfachtem elektrischem Ersatzschaltbild schematisch dargestellt. Dabei ist U_0 die angelegte Kommandospannung, die der EPC-9 entsprechend dem Pulsprotokoll hält; die Kapazität der Zellmembran wird mit C_M bezeichnet. Der Eingangswiderstand R_M wird unter Gigasealbedingungen vor allem durch den Öffnungszustand der in der Membran enthaltenen Kanäle bestimmt, bei schlechteren Meßbedingungen auch von unspezifischen Leckleitfähigkeiten. Der Serienwiderstand R_S ist etwa um den Faktor zwei größer als der Pipettenwiderstand. Aus Gleichung 6 wird ersichtlich, daß es sich dabei um eine Reduktion der Querschnittsfläche A handeln muß, da sich die Länge l der Pipette und der spezifische elektrische Widerstand ρ bei konstanter Temperatur nicht verändern. Diese Verminderung des Querschnittes wird vermutlich von abgerissenen Membranstückchen verursacht.

$$R_S = \frac{\rho \cdot l}{A}$$

Gleichung 6 allgemeine Gleichung zur Bestimmung des elektrischen Längswiderstandes

Unter Vernachlässigung der kapazitiven Ströme ergibt sich aus der 1. Kirchhoff'schen Regel (Knotenregel) für die über R_S und R_M fließenden Ströme nach Anwendung des Ohmschen Gesetzes die Gleichung 7.

$$I_S = \frac{U_0 - U_M}{R_S} = \frac{U_M}{R_M} = I_M$$

Gleichung 7 Ermittlung der Ströme, die über dem Serien- und Eingangswiderstand entsprechend Abbildung 1 fließen

Dadurch kann man eine Abschätzung der tatsächlich in der Zelle vorliegenden Spannung U_M entsprechend der Gleichung 8 errechnen.

Daraus wird ersichtlich, daß nur bei hinreichend großem Eingangswiderstand ($>1 \text{ G}\Omega$) und entsprechend kleinem Serienwiderstand ($<10 \text{ M}\Omega$) davon ausgegangen werden kann, daß die vom EPC-9 ausgegebene Spannung tatsächlich über der Zellmembran anliegt. Würde man diese Bedingungen nicht beachten, käme es durch eine Rechtsverschiebung der I-V-Kurve zu einer Fehlinterpretation des Kanalverhaltens.

$$U_M = U_0 \cdot \frac{I}{I + \frac{R_S}{R_M}}$$

Gleichung 8 Minderung der Kommandospannung durch Eingangs- und Serienwiderstand

Ein kleiner Serienwiderstand ist ebenfalls notwendig für eine hohe Geschwindigkeit, mit der sich ein neuer Spannungswert einstellt. Bei Verwendung der Terminologie der Abbildung 1 ergibt sich, daß entsprechend Gleichung 9 bei Anlegen der Kommandospannung U_0 eine zeitabhängige Spannungsänderung über der Zellmembran aufgrund des kapazitiven Stromflusses vorliegt.

$$U_M(t) = U_0 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right)$$

Gleichung 9 mathematische Beschreibung des kapazitiven Stromflusses

Die Zeitkonstante τ wird nach Armstrong & Gilly 1992 entsprechend Gleichung 10 bestimmt.

$$\tau = C_M \frac{R_M R_S}{R_M + R_S}$$

Gleichung 10 Ermittlung der Zeitkonstante bei kapazitivem Stromfluß

Bei größerem Serienwiderstand würde demzufolge die Zeitkonstante τ entsprechend vergrößert, wodurch die spannungsaktivierten Ionenströme vom kapazitiven Strom überlagert würden. Eine Auswertung der Kinetik der schnellen Aktivierungsphase sowie die Bestimmung der korrekten Stromamplitude wäre dadurch unmöglich. Eine Kalkulation ergibt, daß sich τ bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen im Bereich von $100 \mu\text{s}$ befindet. Der EPC-9 bietet mit der C-Kompensation die Möglichkeit, die kapazitive Komponente mittels Strominjektionen, die über ein RC-Glied geregelt werden, auszugleichen.

Eine genaue kinetische Beschreibung der Kanalleitfähigkeiten ist nur dann möglich, wenn alle Kanäle gleichzeitig dem Spannungspuls ausgesetzt sind. Für die amöboide Form der Mikroglia gilt entsprechend Abbildung 1 voraussichtlich $U_M' = U_M$. Etwas anders stellt sich die space-clamp-Problematik für die ramifizierte Mikrogliazelle dar. Es gibt einige Abschätzungen für Neurone, inwieweit auch bei verzweigten Zellen davon ausgegangen werden kann, daß an jedem Punkt der Zelle dieselbe Spannung anliegt (Jack et al. 1975; Rall 1977; Armstrong & Gilly 1992; Müller & Lux 1993). Da diese theoretischen Berechnungen jedoch sehr spezifisch auf die entsprechenden anatomischen Strukturen ausgelegt sind und unter großer Vereinfachung der realen Gegebenheiten vorgenommen wurden, sei an dieser Stelle nur darauf hingewiesen, daß eine Bestimmung von kinetischen Stromcharakteristika nur bei der amöboiden Form der Mikroglia vorgenommen wurde.

Eine gänzlich andere Quelle der Potentialverfälschung entsteht an den Grenzflächen von Flüssigkeiten unterschiedlicher Zusammensetzung. Dieses liquid junction potential (LJP) entsteht bei der Ganzzelleableitung sowohl an der Grenzfläche Pipettenlösung-Zellinhalt als auch am Übergang intrazelluläres Milieu - extrazelluläre Lösung. Da man davon ausgehen kann, daß es bei korrekter Messung (hinreichend kleiner Serienwiderstand) zu einer effektiven Dialyse des Zellvolumens durch die Pipettenlösung kommt (Pusch & Neher 1988; Marty & Neher 1995), kann man die tatsächlich vorliegende Potentialdifferenz über der Zellmembran (U_M) mit Gleichung 11 beschreiben.

$$U_M = U_p - E_L$$

Gleichung 11 Verschiebung der Potentialdifferenz durch das Liquid Junction Potential

Dabei ist U_p das gemessene Spannungspotential und E_L das LJP zwischen Pipetten- und Badlösung. Es ist möglich, das LJP zu messen oder zu berechnen. Zur Berechnung des LJP

wurde eine modifizierte Form der generellen Henderson-Gleichung nach Barry & Lynch 1991 verwendet.

$$E_L = E^S - E^P = \frac{RT}{F} \cdot S_F \cdot \ln\left(\frac{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i a_i^P}{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i a_i^S}\right)$$

Gleichung 12 theoretische Ermittlung des Liquid Junction Potentials

Dabei ist S_F definiert durch:

$$S_F = \frac{\sum_{i=1}^N z_i u_i (a_i^S - a_i^P)}{\sum_{i=1}^N z_i u_i (a_i^S + a_i^P)}$$

Es sind hierbei u , a und z die Mobilität, die Aktivität und die Valenz (einschließlich des Vorzeichens) der N polyvalenten Ionen; die Indizes S und P beziehen sich auf die Bad- bzw. Pipettenlösung. Eine Abschätzung des LJP, basierend auf einem IGOR Programm, ergab bei den hier verwendeten Lösungen ein Potential von 4 mV, so daß auf eine Korrektur des Liquid Junction Potentials während der Messungen verzichtet wurde.

2.3 Immunzytochemische Untersuchungen

Die immunzytochemischen und morphometrischen Untersuchungen entstanden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Nitsch, Dr. Hailer und Dorit Haas, wobei Frau Haas an der praktischen Durchführung dieser Experimente beteiligt war. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit ACM oder Zytokinen wurden die Mikrogliazellen für die morphologische und immunzytochemische Quantifizierung fixiert. Dazu wurden die Zellen für acht Minuten in PBS (pH=7,4) mit 4 % Paraformaldehyd, 15 % gesättigter Pikrinsäure und 0,1 % Glutaraldehyd fixiert. Vor, während und nach dem Fixiervorgang wurden die Zellen gründlich mit 0,1 M PBS gewaschen.

In einem zweiten Arbeitsschritt wurden die Mikrogliazellen in PBS mit 10 % normalem Ziegen-serum (NGS) für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur wurden die Zellen mit primären Antikörpern (rat anti-mouse LFA-1 α , rat anti-mouse ICAM-1, rat anti-mouse MHC class II), die im Verhältnis 1:100 in 0,1 M PBS mit 0,5 % Triton-X-100 und 1 % NGS gelöst waren, für zwei Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine halbstündige Inkubation mit sekundären

Antikörpern (anti-rat, biotinyliert), die im Verhältnis 1:100 in 0,1 M PBS mit 0,5 % Triton-X-100 aufbereitet waren. Danach wurde eine halbe Stunde die Mikroglia bei 4 °C mit im Verhältnis 1:25 in 0,1 M PBS gelöstem Avidin-Biotin-Komplex (ABC) inkubiert, der durch eine Inkubation mit 0,1 % 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in 0,1 M PBS mit 0,03 % H₂O₂ detektiert wurde.

Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Färbungsintensitäten bezüglich ICAM-1, MHC Klasse II und LFA-1 lichtmikroskopisch mit einer CCD-Kamera (Modell XC-77CE, Sony, Japan) aufgenommen und mit den modifizierten AMBA Programmen „imagesav.a“ und „int_mes.a“ (IBSB GmbH, Berlin, Deutschland) analysiert. Von mindestens drei verschiedenen Kulturen wurden mehrere Blickfelder von mindestens drei Plättchen ausgewertet. Zur Vergleichbarkeit der Daten wurden die Färbungswerte so normalisiert, daß die Werte zwischen 0 (keine Färbung) und 1 (vollständige Färbung) lagen. Ihre Angabe erfolgt in der Form Mittelwert ± S.E.M..

2.4 Morphometrische Quantifizierung

Zur quantitativen Analyse der morphologischen Veränderungen wurden Mikrogliazellen benutzt, die analog zum ersten Arbeitsschritt der immunzytochemischen Untersuchung fixiert wurden. Es wurden nur Zellen ausgewertet, die für den Mikroglia-/Makrophagenmarker CD-11b positiv waren. Vergleichbar der Immunzytochemie wurden die Bilder mehrerer Plättchen verschiedener Kulturen mittels CCD-Kamera digitalisiert.

Da sich der Ramifikationsprozeß in Kultur, im Gegensatz zu *in vivo* Bedingungen, vor allem entlang einer zweidimensionalen Ebene, die durch das Glasplättchen definiert wird, vollzieht, wurde aus Gründen der Praktikabilität auf aufwendige dreidimensionale Verfahren verzichtet.

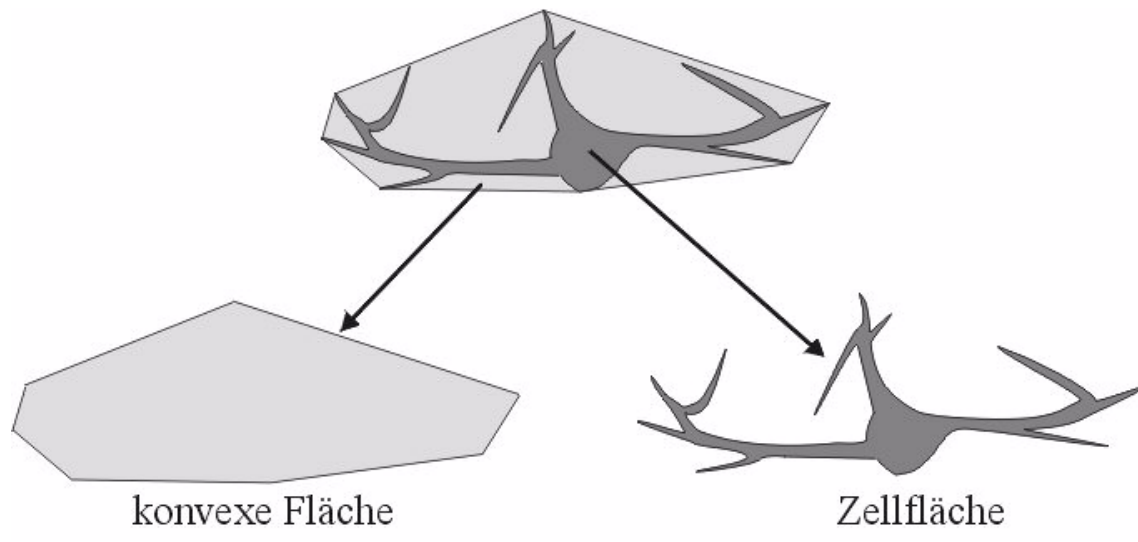


Abbildung 2 Illustration der zur Berechnung des Ramifikationsindexes verwendeten Flächen

Zur Quantifizierung der morphologischen Veränderung wurde deshalb der Ramifikationsindex RI nach Heppner et al. 1998 berechnet (siehe auch Abbildung 2). Der Ramifikationsindex berechnet sich danach als Quotient aus Zellfläche zu konvexer Fläche, welche als polygonales Objekt entlang der weitläufigsten Zellausläufer eine Hüllfigur für die Zellfläche darstellt. Demzufolge ist RI ein Wert, der sich zwischen 0 (kaum Zellvolumen, weitverzweigte Zelle) und 1 (eine kreisrunde Zellkontur) bewegt. Die Ramifikationindizes wurden als Mittelwerte \pm S.E.M. ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische und immunphänotypische Charakterisierung der Mikrogliazellkulturen

In einer ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob und wie die Behandlung von Mikroglia-kulturen mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) die Morphologie der Mikrogliazellen verändern kann. Mikroglia in Sekundärkultur ist durch eine amöboide Zellform charakterisiert, wie sie in Abbildung 3A zu sehen ist. Man erkennt die typischen kleinen Somata, die sich durch eine runde bis spindelförmige Gestalt auszeichnen. Nach vierundzwanzigstündiger Zugabe von ACM war eine deutliche Veränderung der Morphologie zu beobachten (1d ACM: Abbildung 3B). Die Somata der Zellen bildeten ausgeprägte Verzweigungen, die sogenannten Rami, aus, die sich teilweise sekundär und tertiär teilten.

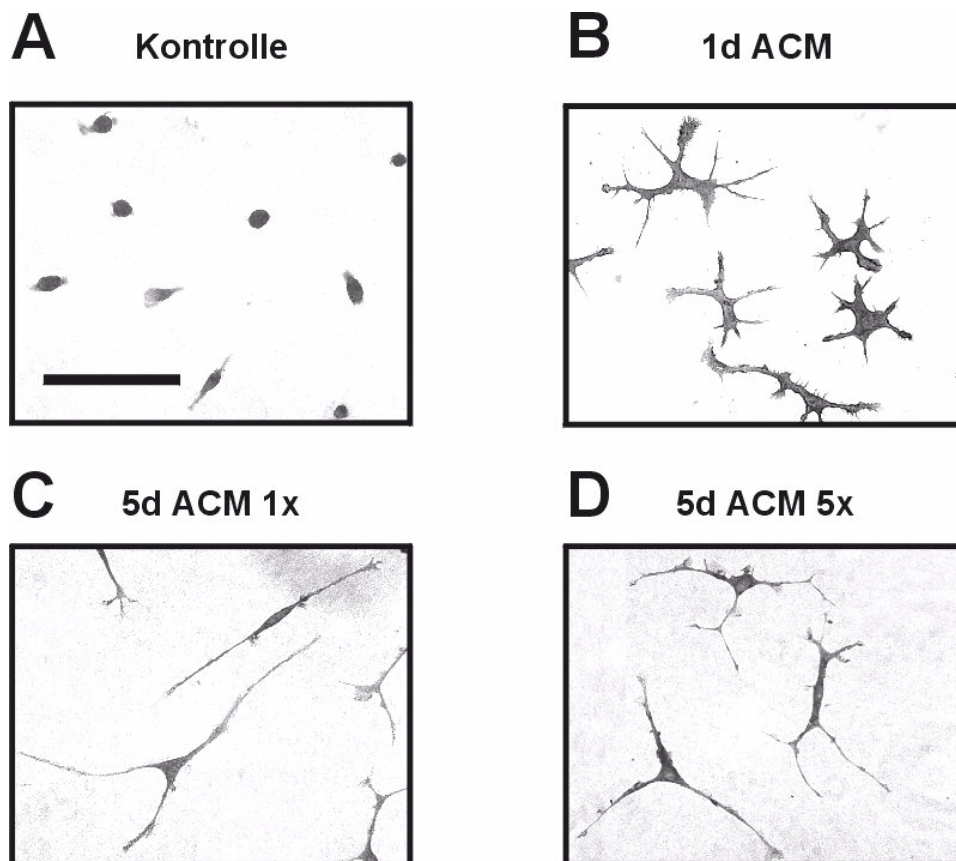


Abbildung 3 Auslösung des Ramifikationsprozesses durch ACM: A-sekundäre Mikroglia-kultur nach eintägigen Kontrollbedingungen (Kalibrationsbalken entspricht 100 μ M); B-morphologische Veränderungen nach eintägiger Zugabe von ACM; C+D-Fixierung der Sekundärkultur nach fünftägiger ACM-Inkubation (D: täglicher Wechsel des Mediums)

Es wurde weiterhin überprüft, ob eine Verstärkung des Ramifikationsgrades dadurch erreicht werden kann, daß man die Zellen einen längeren Zeitraum dem ACM aussetzt. Dazu wurde die Mikroglia fünf Tage lang in ACM kultiviert, wobei der Mediumwechsel entweder einmal für fünf Tage (5d ACM 1x: Abbildung 3C) oder fünfmal täglich (5d ACM 5x: Abbildung 3D) erfolgte. Optisch konnte kein deutliches Fortschreiten des Ramifikationsprozesses registriert werden. Um diese Beobachtung zu bestätigen und eine quantitative Aussage treffen zu können, wurde für die verschiedenen Bedingungen der Ramifikationsindex RI, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, ermittelt. In Abbildung 4 ist deutlich zu erkennen, daß sich der Ramifikationsindex von $0,75 \pm 0,004$ ($n=1211$) für die Kontrollpopulation durch Zugabe von ACM nach einem Tag auf $0,32 \pm 0,01$ ($n=183$) verringerte. Dieses Ergebnis ist im Mann-Whitney-U-Test mit $p<0,001$ signifikant. Im Gegensatz zum mikroskopisch-optischen Eindruck wurde eine weitere Reduzierung des RI für fünftägiges Zusetzen von ACM auf $0,29 \pm 0,01$ ($n=375$) beziehungsweise für fünfmaliges Hinzufügen von ACM auf $0,21 \pm 0,005$ ($n=607$) ermittelt. Mit dem U-Test konnte sowohl in bezug auf die Kontrolle als auch auf die eintägige ACM-Zugabe ein Signifikanzniveau von $p<0,001$ ermittelt werden.

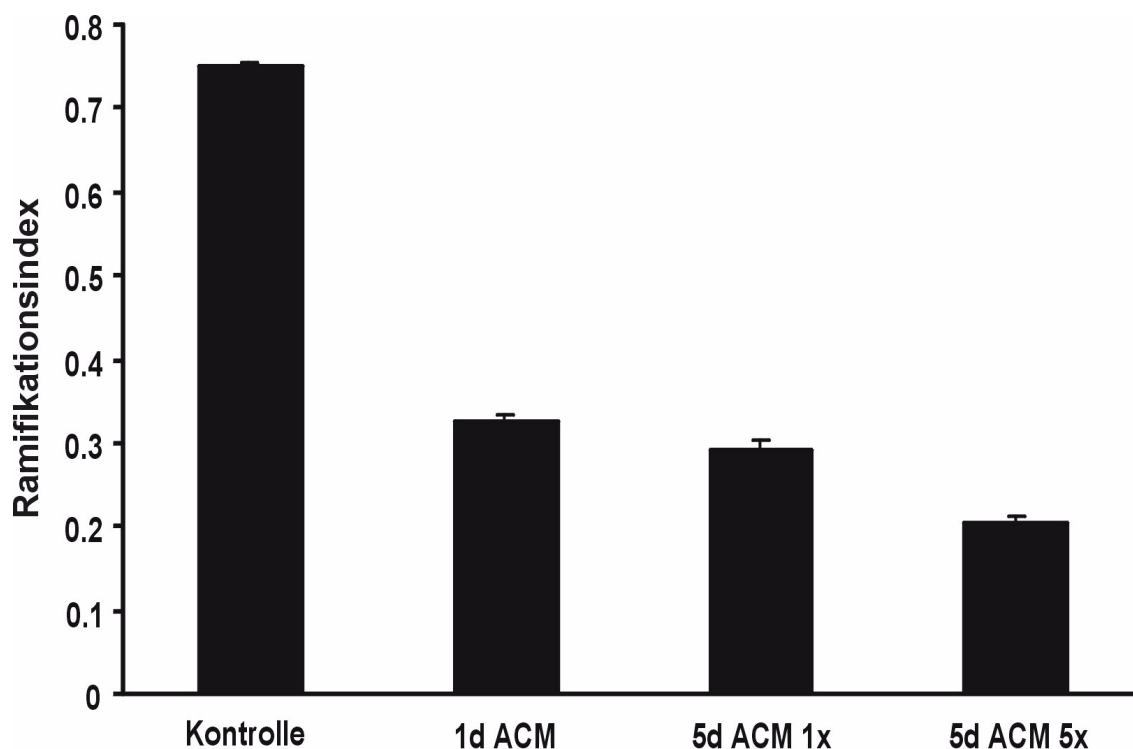


Abbildung 4 Mittelwerte der Ramifikationsindizes nach Zugabe von ACM für verschiedene Zeiträume

Zur Überprüfung, inwieweit die morphologische Modifizierung der Mikroglia von einer Änderung des immunologischen Status begleitet wird, wurde die Expression verschiedener

Oberflächenantigene untersucht. Im einzelnen handelt es sich um den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC Klasse II), das Lymphozytenfunktionsantigen 1 (LFA-1) sowie das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Wie in Kapitel 2.3 erwähnt, bedeutet eine starke Expression des entsprechenden Moleküls starke Färbung im immunzytochemischen Bild sowie eine Färbungsintensität nahe eins, wohingegen eine schwache Expression mit einer schwachen Anfärbung der Zelle sowie einem Intensitätswert nahe null einhergeht.

In Abbildung 5 sind Beispiele für die Expression von MHC Klasse II auf Mikrogliazellen unter Kontrollbedingungen (Abbildung 5A), nach eintägiger (Abbildung 5B) sowie nach fünftägiger Inkubation mit ACM (Abbildung 5C) zu sehen. Eine deutliche Abnahme der Färbung ist erst nach fünf Tagen zu erkennen; die Färbung der Zellen unter Kontrollbedingungen sowie nach eintägiger ACM-Zugabe unterscheiden sich trotz morphologischer Veränderungen kaum.

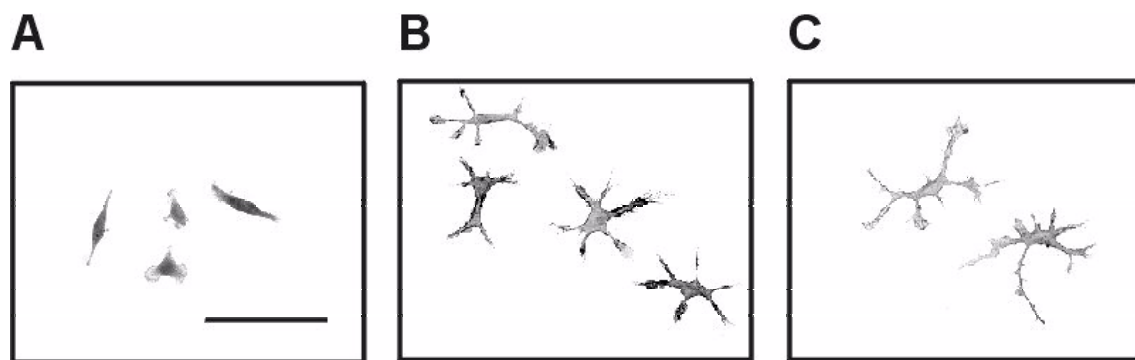


Abbildung 5 immunzytochemische Färbung zur Detektion von MHC Klasse II Molekülen auf Mikrogliazellen; A-Expression des Antigens unter Kontrollbedingungen (Kalibrationsbalken: 50 µm); B-keine Veränderung der MHC-Färbung nach eintägiger ACM-Inkubation, jedoch deutliche Ramifizierung; C-nach fünftägiger Kultivierung in ACM Reduktion der Färbung durch Herunterregulierung der Antigene

Eine Objektivierung der Beobachtung ergab sich durch Ermittlung der Färbungsintensitäten, wie sie in Abbildung 6 dargestellt sind. Dabei sind die Zellen jeweils für fünf Tage entweder ACM oder dem Kontrollmedium ausgesetzt gewesen; es wurde nur einmal das Medium gewechselt. Anhand der vorliegenden Daten wird deutlich, daß sowohl das Vorkommen der Haupthistokompatibilitätsantigene Klasse II als auch der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 unter dem Einfluß der astrozytären Faktoren gegenüber den Kontrollbedingungen deutlich reduziert ist. Dies konnte mit dem Mann-Whitney-U-Test für ein Signifikanzniveau $p < 0,001$ verifiziert werden.

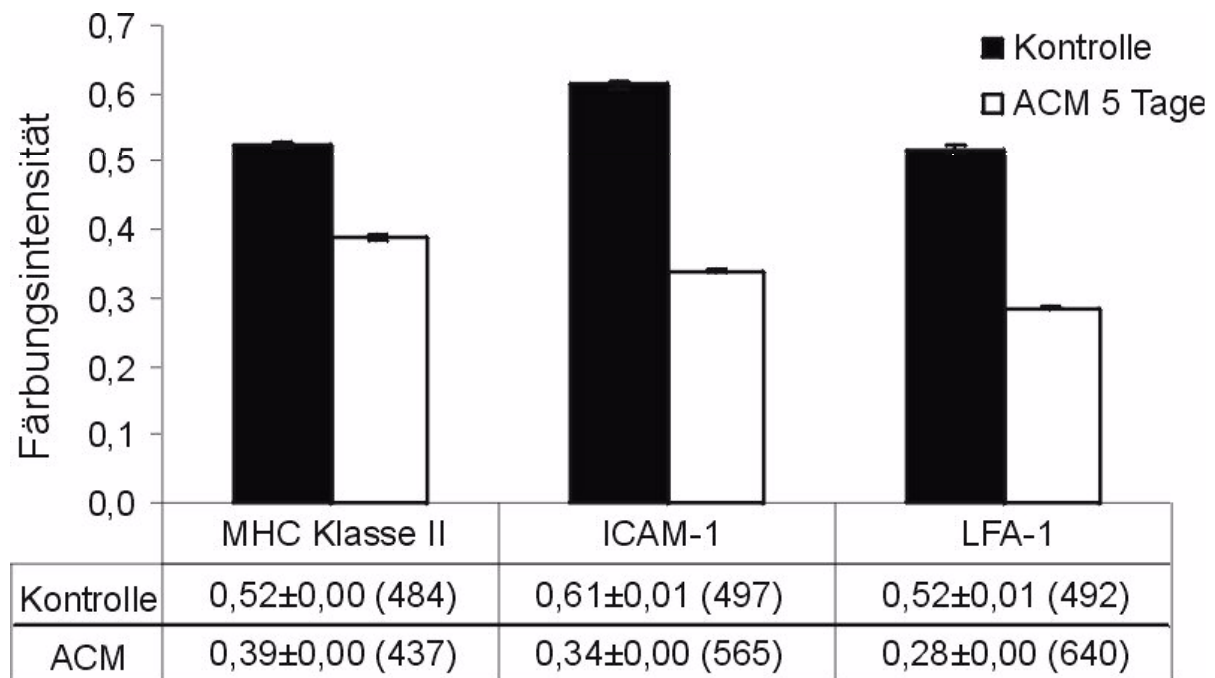


Abbildung 6 Färbungsintensitäten verschiedener Oberflächenantigene nach fünf Tagen unter Kontrollbedingungen oder nach Zugabe von ACM; die Angaben in Klammern entsprechen der Anzahl der untersuchten Zellen

3.2 Identifikation der astrozytären Faktoren, welche die morphologischen Veränderungen bewirken

Aus den Ergebnissen des vorigen Kapitels ergab sich die Hypothese, daß im ACM enthaltene Zytokine die morphologischen und immunologischen Veränderungen an der Mikroglia bewirken. Deshalb wurden Experimente ausgeführt, in denen der Einfluß von neutralisierenden Antikörpern auf die ACM induzierten Modifikationen untersucht wurde. Dazu wurde dem ACM, mit dem die Sekundärkulturen für einen Tag inkubiert wurden, Antikörper gegen alle TGF- β -Isoformen (anti-pan-TGF- β), gegen GM-CSF (anti-GM-CSF) oder gegen M-CSF (anti-M-CSF) in einer Konzentration von 1-5 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben, um die entsprechenden Zytokine zu neutralisieren. Die statistische Auswertung der ermittelten Ramifikationsindizes ist in Abbildung 7 grafisch dargestellt.

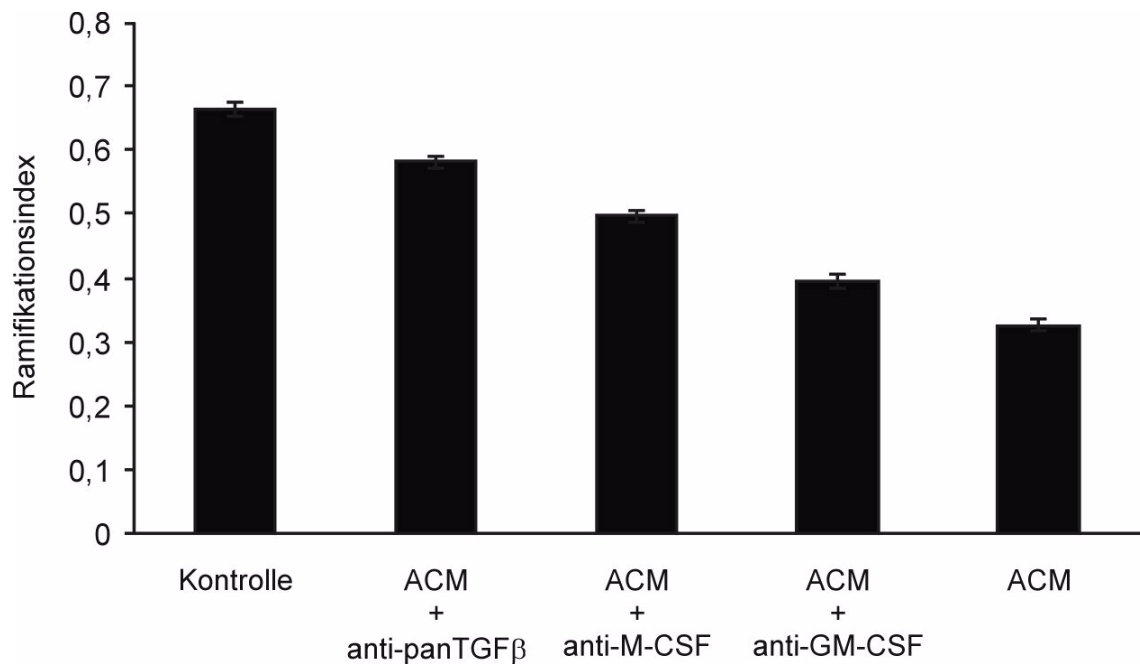


Abbildung 7 Wirkung von neutralisierenden Antikörpern auf durch ACM beeinflusste Ramifikationsindizes sekundärer Mikrogliaulturen

Als Negativkontrolle ergab sich für die nicht mit ACM behandelten Zellen ein RI von $0,66 \pm 0,01$ ($n=212$); im Gegensatz dazu wiesen die dem ACM ausgesetzten Zellen ($n=183$) einen RI von $0,33 \pm 0,01$ auf. Den deutlichsten inhibitorischen Effekt auf die Ramifizierung wies der Antikörper gegen TGF- β mit einem Ramifikationsindex von $0,58 \pm 0,01$ ($n=204$) auf, ebenfalls unverkennbar hemmte die Neutralisation von M-CSF die Ramifizierung ($0,49 \pm 0,01$; $n=252$). Im Gegensatz dazu wurde die Ramifizierung durch anti-GM-CSF kaum beeinflusst ($RI=0,39 \pm 0,01$; $n=187$).

Da die morphologischen Veränderungen unter ACM zumindest partiell von Zytokinen vermittelt werden, wurde als komplementäres Experiment getestet, inwieweit diese Zytokine in der Lage sind, direkt eine Ramifizierung auszulösen. Dazu wurde dem Medium der Sekundärkulturen ein rekombinantes Zytokin in einer Konzentration von 50-100 ng/ml hinzugefügt und nach einem Tag der Ramifikationsindex bestimmt. Die in Abbildung 8 grafisch dargestellten Ergebnisse weisen für die Negativkontrolle ohne Zusatz eines Zytokins einen RI von $0,63 \pm 0,01$ ($n=255$) und für die Positivkontrolle unter dem Einfluß von ACM einen RI von $0,35 \pm 0,01$ ($n=273$) aus. Mit einem RI von $0,66 \pm 0,01$ ($n=257$) für TGF- β 1 bzw. $0,73 \pm 0,01$ ($n=245$) für TGF- β 2 ist keine signifikante Ramifizierung der Mikroglia durch Zugabe von TGF- β erreicht worden. Der Ramifikationsindex für GM-CSF behandelte Mikrogliazellen deutet mit $0,45 \pm 0,01$ ($n=472$) eine

Formveränderung an. Die RI nach Zugabe von M-CSF ($0,34 \pm 0,00$; $n=448$) und von allen drei Zytokinen ($0,36 \pm 0,01$; $n=282$) waren den Werten nach ACM-Inkubation am ähnlichsten.

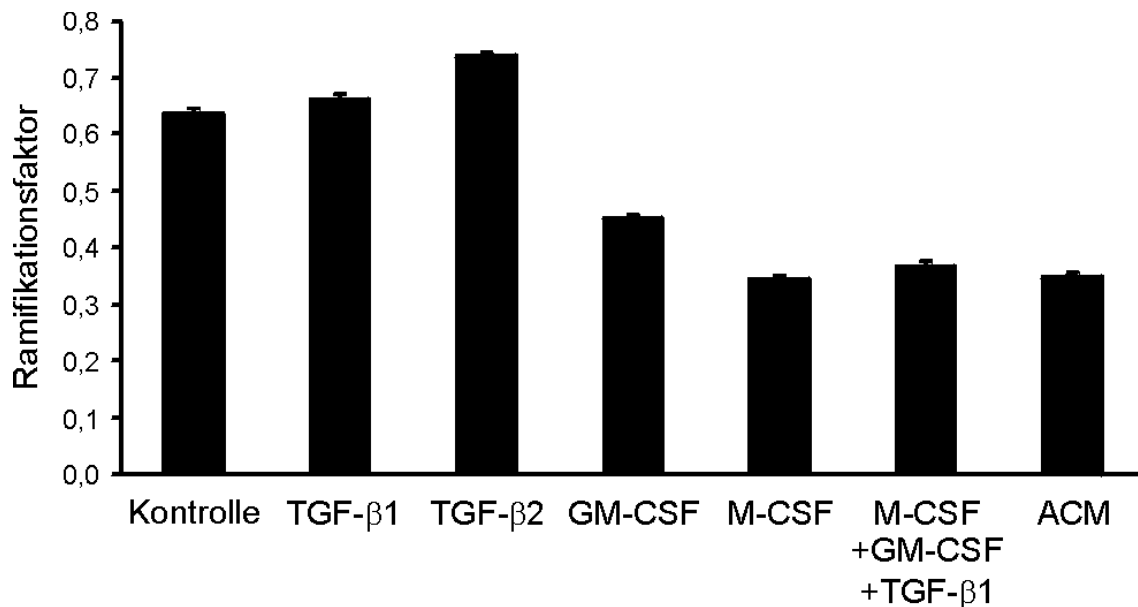


Abbildung 8 Einfluß von eintägiger Zytokinzugabe auf den Ramifikationsindex der sekundären Mikroglia kulturen

Die statistische Analyse mittels des Mann-Whitney-U-Testes ergab, daß die Ramifikationsindizes nach Exposition mit M-CSF, GM-CSF und allen drei Zytokinen sich signifikant ($p < 0,001$) von dem RI unter Kontrollbedingungen unterschied, während der RI nach Behandlung mit TGF-β1 mit $p > 0,05$ nicht davon abwich. Im Vergleich zur Mikroglia, die mit ACM für einen Tag kultiviert wurde, war der Ramifikationsindex für GM-CSF behandelte Zellen signifikant ($p < 0,001$) verschieden, während für die Bedingungen M-CSF bzw. alle Zytokine kein statistischer Unterschied ($p > 0,1$) festgestellt werden konnte.

Da der Ramifikationsindex zwar zur Quantifizierung des Ramifikationsprozesses geeignet ist, jedoch keine qualitativen Aussagen über die Art der Formveränderung der Mikrogliazellen erlaubt, sind in Abbildung 9 exemplarisch zytologische Veränderungen von Mikroglia für die untersuchten Zytokine dargestellt. Nach Inkubation mit GM-CSF (Abbildung 9A) ist die Morphologie der Mikroglia deutlich von der Morphologie nach ACM (Abbildung 9D) zu unterscheiden, was sich u.a. in den unterschiedlichen Ramifikationsindizes widerspiegelt.

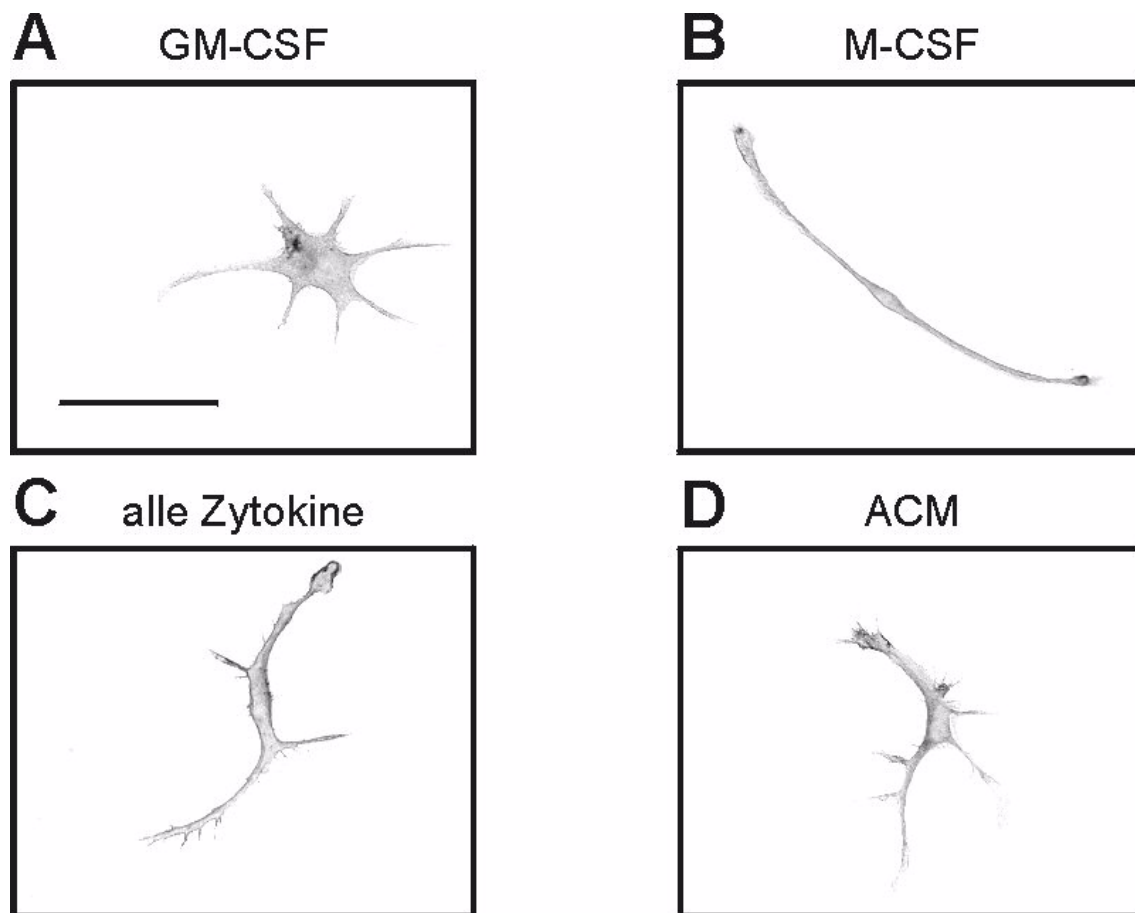


Abbildung 9 Beispiele für die Morphologie von Mikroglia nach Zugabe von Zytokinen: A-GM-CSF 50 ng/ml (Kalibrationsbalken: 100 μ m); B-M-CSF 50 ng/ml; C-GM-CSF (50 ng/ml) +M-CSF (50 ng/ml) +TGF- β 1 (50 ng/ml); D-ACM

Betrachtet man den RI für Zellen, die entweder mit ACM, mit M-CSF oder mit allen drei Zytokinen behandelt wurden, so überrascht, daß die Morphologie der nur mit M-CSF inkubierten Mikroglia sich deutlich von der der anderen beiden Gruppen unterscheidet. Bei alleinigem Zusetzen von M-CSF haben die Zellen häufig eine prolongierte Form angenommen mit zwei diametral vom Soma ausgewachsenen Rami (Abbildung 9B). Im Gegensatz dazu haben die mit GM-CSF, TGF- β und M-CSF behandelten Mikrogliazellen (Abbildung 9C) eine Form mit unregelmäßigen, sekundären Verzweigungen angenommen, die derjenigen von ACM am ehesten entspricht.

3.3 Elektrophysiologische Analyse spannungsaktivierter Kaliumkanäle in ruhender Mikroglia

Die Kaliumstrommessungen wurden an Mikrogliazellen durchgeführt, die mit ACM in einen immunologisch ruhenden Zustand überführt wurden. Zur Ermittlung des Auftretens von Kaliumströmen wurden die Lösungen L_{exNa} und L_{int} verwendet. Sofort nach Erreichen der Ganzzell-

konfiguration wurden die Zellen auf einem Potential von -60 mV gehalten, welches dem durchschnittlichen Membranpotential von Mikrogliazellen nahekommt.

Zur Detektion von Kaliumeinwärtsströmen wurden die Zellen für 200 ms vom Haltepotential ausgehend in 10 mV Schritten von -60 mV bis -150 mV hyperpolarisiert. Analog dazu wurden Kaliumauswärtsströme durch 200 ms dauernde Potentialsprünge ausgelöst, die die Mikroglia schrittweise in 10 mV Abständen von -60 mV bis $+30$ mV depolarisierten. Der Zeitabstand zwischen zwei aufgezeichneten Kurven betrug jeweils 30 s.

In Abbildung 10A ist ein charakteristisches Beispiel für das Auftreten der Kaliumströme in unbehandelten Mikrogliazellen ohne grafische Subtraktion der Leckleitfähigkeiten dargestellt. Deutlich aktiviert der Einwärtsstrom (I_{IR}) ab einem Potential von -80 mV und zeigt ab einem Potential von -120 mV einen zeitabhängigen Stromabfall. Bei Anlegen depolarisierender Potentiale wurde kein spannungsaktivierter Kaliumstrom (I_{DR}) registriert.

Wurden im Gegensatz dazu die Zellen vierundzwanzig Stunden vor der Messung mit ACM inkubiert, so ergab sich ein Strommuster, das dem in Abbildung 10B entspricht. Auch hier zeigt sich bei hyperpolarisierenden Pulsen ein Strombild, das einen einwärts gleichrichtenden Kaliumstrom kennzeichnet. Bei Depolarisation bietet sich im Vergleich zur Kontrolle ein gänzlich anderes Bild; es aktiviert ein Auswärtsstrom ab einem Potential von -30 mV, der bei höheren Potentialen eine größere Amplitude und ein schnelleres Erreichen des Maximalwertes aufweist.

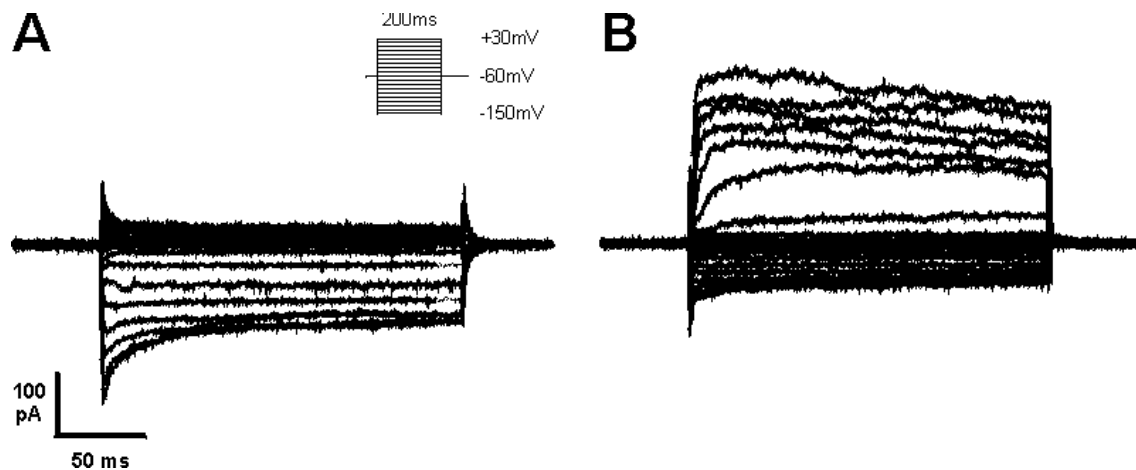


Abbildung 10 Typische Kaliumstrommuster der Ein- und Auswärtsströme bei Mikrogliazellen: A-Kontrolle; B-nach eintägiger ACM-Exposition

Da in Kapitel 3.6 die Eigenschaften des auftretenden Auswärtsstromes näher bestimmt werden, sei hier nur auf den zeitlichen Verlauf der Expression dieses Stromes eingegangen. Der prozentuale Teil von Mikrogliazellen, der unter Kontrollbedingungen sowie nach ACM-Exposition

über einen Kaliumeinwärtsstrom bzw. Kaliumauswärtsstrom verfügte, ist in Abbildung 11 dargestellt. Sowohl in Kontrolle als auch nach ein bzw. fünf Tagen in Astrozyten-konditioniertem Medium wiesen alle Zellen einen Einwärtsstrom auf.

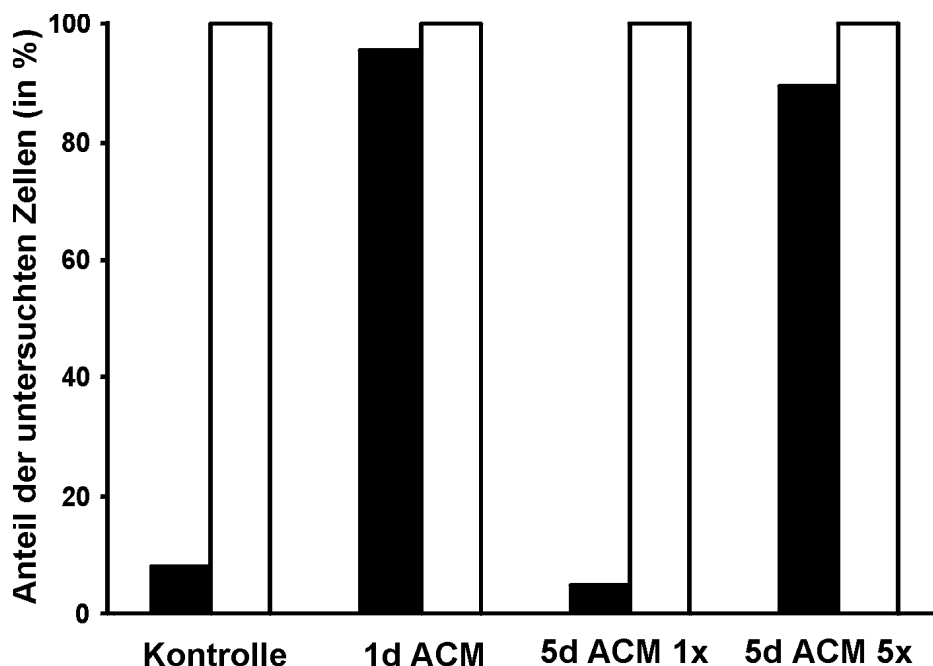


Abbildung 11 Anteil der Mikrogliazellen, die einen Kaliumein- (offene Balken) bzw. – auswärtsstrom (geschlossene Balken) ohne oder mit ACM-Inkubation aufwiesen; Beschriftung analog zu Abbildung 3 und Abbildung 4

Demgegenüber zeigten sich deutliche Unterschiede im Kaliumauswärtsstromprofil. Während in guter Übereinstimmung zu Abbildung 10 nur 8,3 % der Zellen unter Kontrollbedingungen einen Auswärtsstrom aufwiesen, stieg der Anteil auf 95,6 % nach einem Tag Kultivierung in ACM. Interessanterweise fiel dieser Prozentsatz nach fünf Tagen wieder nahezu auf das Kontrollniveau (4,8 %), während er bei täglichem Ersetzen des ACM bei 89,5 % stabil blieb. Um einen Artefakt durch das Trauma des Mediumwechsels auszuschließen, wurde auch unter Kontrollbedingungen das Medium entsprechend ausgewechselt.

3.4 Bestimmung des astrozytären Faktors, der den spannungsaktivierten Kaliumauswärtsstrom induziert

Da bekannt ist, daß einige Zytokine im Rahmen des Aktivierungsprozesses der Mikroglia einen Kaliumauswärtsstrom induzieren können und Astrozyten die Möglichkeit haben, eine Reihe von Zytokinen unter verschiedenen Bedingungen *in vitro* und *in vivo* zu sezernieren, wurde untersucht, welcher Faktor im Astrozyten-konditionierten Medium die Expression des Kaliumauswärtsstromes bewirkt.

Dazu wurden dem ACM, bevor es für einen Tag zu den Mikrogliasekundärkulturen gegeben wurde, zur Neutralisation der jeweiligen Zytokine Antikörper gegen murines TGF- β (anti-pan-TGF- β , 100 ng/ml) oder gegen GM-CSF (anti-GM-CSF, 100 ng/ml) hinzugefügt. Nach einem Tag wurden die Kaliumauswärtsströme gemessen. Anschließend wurden die Stromdichten entsprechend Gleichung 2 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 grafisch dargestellt.

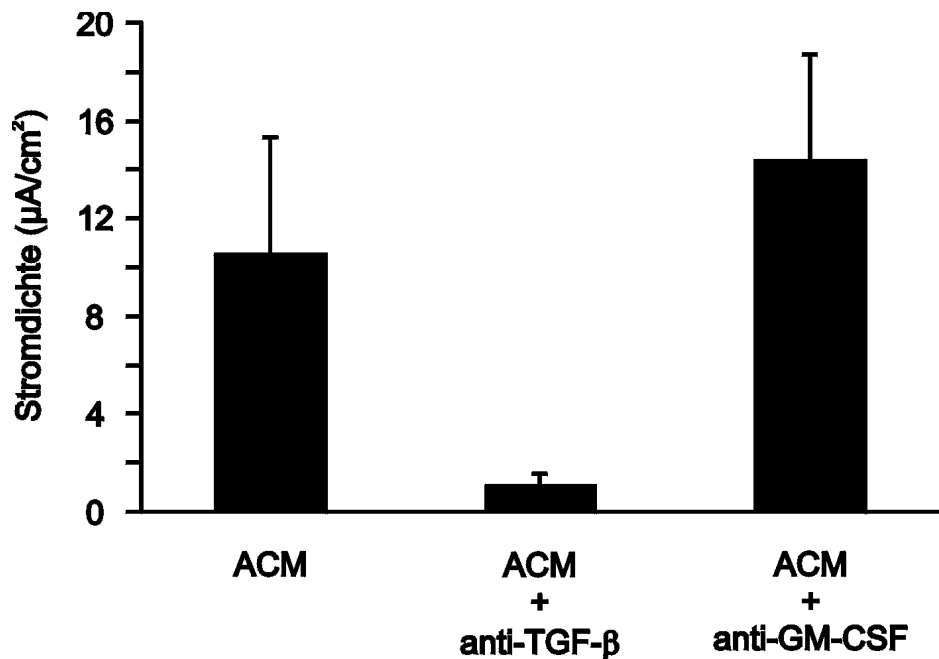


Abbildung 12 mittlere Stromdichte I_p der Kaliumauswärtsströme muriner Mikroglia nach eintägiger ACM-Exposition; Konzentration der neutralisierenden Antikörper: 100 ng/ml

Für die Auswärtsströme der Mikrogliazellen, die ACM ohne Antikörper ausgesetzt waren, ergab sich eine mittlere Stromdichte von $10,5 \pm 4,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=17$). Mit einer Stromdichte von $14,4 \pm 4,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=14$) resultierten keine signifikanten Veränderungen durch das Zusetzen von anti-GM-CSF zu ACM, was durch den Mann-Whitney-U-Test ($p>0,1$) bestätigt wird. Ein konträres Bild bietet sich nach der Zugabe von anti-pan-TGF- β zum Astrozyten-konditionierten Medium; mit einer mittleren Stromdichte I_p von $1,0 \pm 2,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=15$) ist die Induktion des Auswärtsstromes durch ACM deutlich inhibiert worden. Die statistische Signifikanz erweist der U-Test mit einem Niveau von $p<0,001$.

3.5 Untersuchung der einwärts gleichrichtenden Kaliumströme an TGF- β behandelten Mikrogliazellen

Da hiermit nachgewiesen ist, daß es sich bei TGF- β um denjenigen Faktor handelt, der im ACM die Induktion der Kaliumauswärtsströme bewirkt, wurde zum Ausschluß des Einwirkens anderer löslicher astrozytärer Faktoren die weitere Kanalcharakterisierung an TGF- β stimulierten Mikrogliazellen vorgenommen. Dazu wurde TGF- β 1, in einigen Experimenten auch TGF- β 2, 24 Stunden vor Durchführung der Patch-clamp-Experimente dem Kulturmedium (DMEM und 10 % FCS) in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugegeben.

3.5.1 Vergleich der Stromdichten

Für die Stromdichtenermittlung der Kaliumeinwärtsströme an Mikrogliazellen wurden für die Patch-clamp-Messungen die Lösungen L_{exNa} und L_{int} verwendet. Dabei wurden die Zellen nach Etablierung der Ganzzellkonfiguration auf ein Haltepotential von -60 mV geklemmt und anschließend in einem Zeitabstand von 30 s schrittweise in 10 mV Abständen für 200 ms auf Potentiale zwischen -70 mV und -150 mV gebracht.

In Abbildung 13A ist ein typisches Strombild bei Hyperpolarisation von sekundärer Mikrogliazellen gezeigt. Es zeigt mit einer Aktivierungsschwelle von -90 mV und der zeitabhängigen Inaktivierung bei starker Hyperpolarisation den unverkennbaren Verlauf des einwärts rektifizierenden Kaliumstroms. Auch bei den Zellen, die entweder einen Tag lang mit 10 ng/ml TGF- β 1 (Abbildung 13B) oder TGF- β 2 (Abbildung 13C) kultiviert wurden, war ein ähnliches Strommuster nach Hyperpolarisation der Zellmembran erkennbar.

Um eine Vergleichbarkeit der Expression dieses Stromes in den untersuchten Populationen zu erreichen, wurden die maximalen Stromamplituden bei -150 mV ermittelt und gemäß Gleichung 2 die Stromdichte berechnet. Die mittleren Werte sind in Abbildung 13D dargestellt. Für die Kontrolle ergab sich eine durchschnittliche Stromdichte von $10,7 \pm 2,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=26$). Eine wesentliche Veränderung der mittleren Stromdichte des I_{IR} konnte nach Inkubation mit TGF- β 1 bzw. mit TGF- β 2 nicht festgestellt werden. Mit einem Wert von $10,9 \pm 1,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=31$) für TGF- β 1 beziehungsweise $11,7 \pm 3,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=9$) lagen ähnliche Stromdichten für den Einwärtsstrom auch bei diesen Zellpopulationen vor. Da mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest eine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte, wurde mit Hilfe von Student's t-Test belegt, daß die Abweichungen der Mittelwerte keine signifikante Veränderungen darstellten ($p>0,5$).

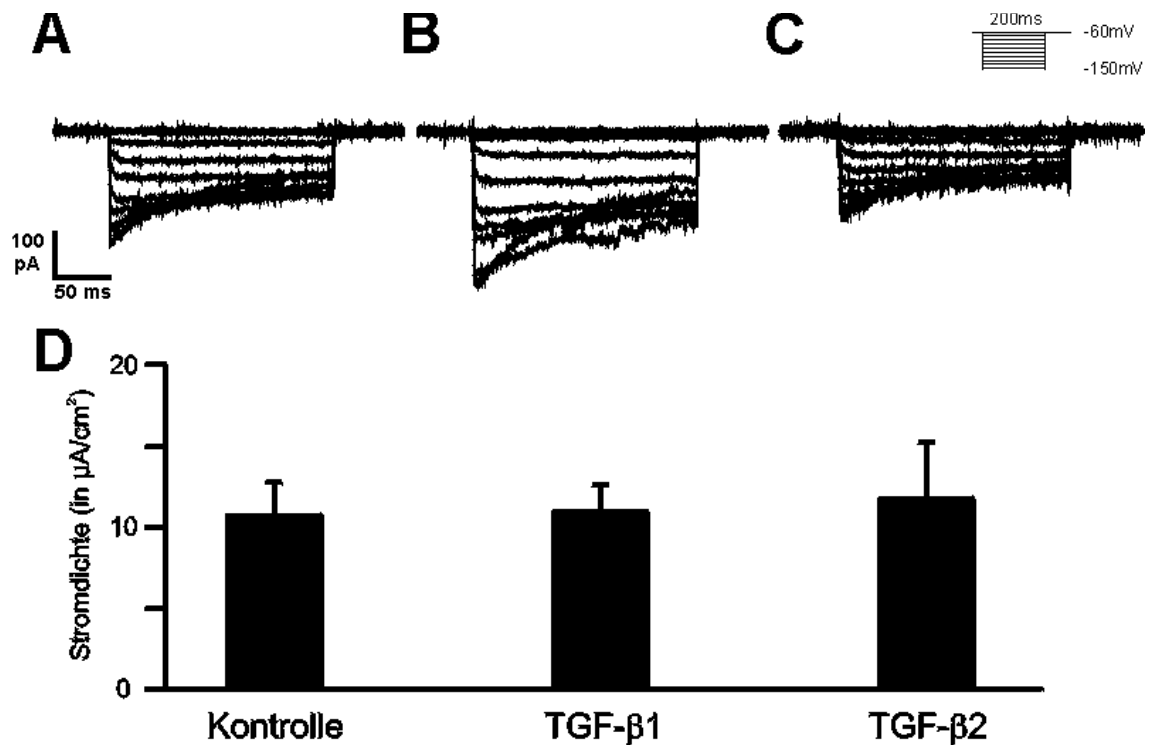


Abbildung 13 Auftreten der Kaliumeinwärtsströme an Mikrogliazellen; A- I_{IR} bei unbehandelter Kontrolle; B-Einwärtsstrom nach eintägiger Inkubation mit TGF-β1 (10 ng/ml); C-Kaliumeinwärtsstrom bei sekundärer Mikroglia nach Kultivierung mit TGF-β2 (10 ng/ml); D-Ermittlung der mittleren Stromdichten bei einem Potential von -150 mV für die Bedingungen entsprechend A-C

3.5.2 Pharmakologische Charakterisierung der Einwärtsströme

In weiteren Untersuchungen wurde ermittelt, ob der Kaliumeinwärtsstrom der TGF-β1 behandelten Zellen δ -Dendrotoxin- und bariumsensitiv ist. Dazu kamen diejenigen Lösungen und Pulsprotokolle zur Anwendung, die bereits im vorherigen Kapitel beschrieben wurden.

Die Wirkung von Barium auf den Einwärtsstrom wird in Abbildung 14A und B gezeigt. In A sieht man das klassische Aktivierungsverhalten des I_{IR} bei hyperpolarisierenden Pulsen. In B wird die Stromantwort derselben Zelle gezeigt, nachdem sie mit 1 mM BaCl_2 superfundiert wurde. Nach Subtraktion der Leckleitfähigkeiten wird deutlich, daß kein Stromfluß über die Zellmembran mehr meßbar ist. Für $n=10$ Experimente ergab sich so eine bariuminduzierte Reduktion der bei -150 mV ermittelten Stromdichte von $13,5 \pm 3,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $0,8 \pm 0,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Mit einem gepaarten t-Test wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ für dieses Ergebnis ermittelt.

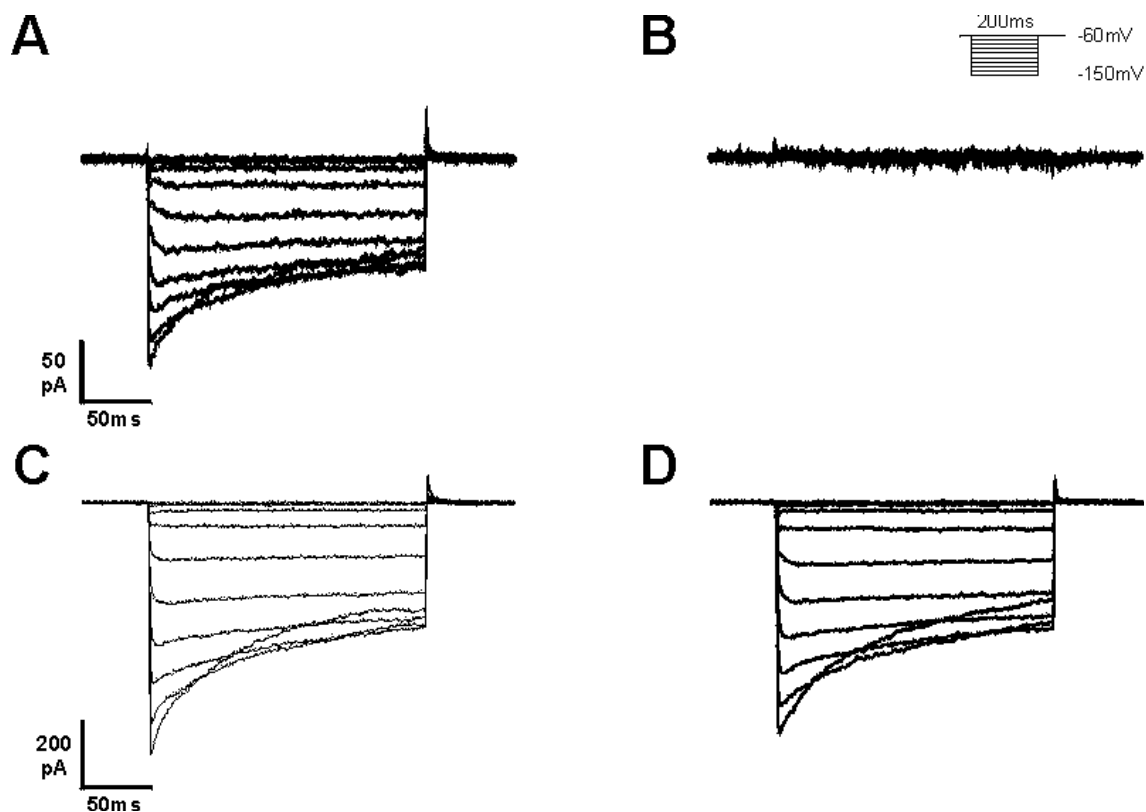


Abbildung 14 Wirkung von Barium und δ -Dendrotoxin auf den Einwärtsstrom TGF- β 1 behandelter Zellen (Darstellung der leaksubtrahierten Kurven); A-Aktivierung eines Einwärtsstromes bei Hyperpolarisation; B-Blockierung des Stromes derselben Zelle nach Applikation von 1 mM Ba^{2+} über eine Perfusionspipette; C- I_{IR} einer anderen Mikrogliazelle; D-keine Veränderung des Strombildes nach Superfusion von 100 nM δ -DTX

Ein ähnliches Experiment mit δ -Dendrotoxin ist in Abbildung 14 dargestellt. In Abbildung 14C sieht man die Stromantwort auf Hyperpolarisationspulse; zur Vergleichbarkeit der Bedingungen wurde die Mikrogliazelle in extrazellulärer Lösung L_{exNa} mit 0,1 % Albuminzusatz gemessen. Dieselbe Zelle zeigte, wie in Abbildung 14D zu erkennen ist, nach Superfusion mit 100 nM δ -DTX in 0,1 % Albuminlösung keine Veränderung des Einwärtsstrombildes. Für fünf Experimente ergab sich in der Kontrolle bei -150 mV eine mittlere Stromdichte von $10,7 \pm 6,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, nach Applikation des δ -Dendrotoxins betrug sie $10,5 \pm 5,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Dieser Unterschied wurde im gepaarten t-Test mit $p > 0,5$ als nicht signifikant ausgewiesen.

Eine weitere Untersuchung der Kaliumeinwärtsströme ging der Frage nach, ob in ruhender Mikroglia der an Mikrogliazelllinien beschriebene HERG-Strom nachweisbar ist. Dazu wurden die Lösungen L_{int} und die natriumfreie L_{exK} für die Patch-clamp-Messungen verwendet. Nach Stabilisierung der Zelle in der Ganzzellkonfiguration wurde ein Haltepotential von 0 mV über

der Membran angelegt. Anschließend wurden die Mikrogliazellen für 200 ms von 0 bis -160 mV in 20 mV Dekrementschritten hyperpolarisiert.

Ein Beispiel für ein derartiges Experiment ist in Abbildung 15 gegeben. Man erkennt in Abbildung 15A einen Strom, der sich durch eine Aktivierung bei -20 mV auszeichnet und keine zeitabhängige Amplitudenreduktion, wie sie typischerweise in natriumhaltiger Extrazellulärlösung zu erwarten wäre, zeigt. Bei Superfusion mit 0,1 mM Bariumchloridlösung kann man, wie in Abbildung 15B dargestellt, einen spannungs- und zeitabhängigen Block des Einwärtsstromes erkennen. Superfundiert man diese Zelle mit 1 mM BaCl_2 , so zeigt sich, wie in Abbildung 15C, ein Strombild, das nahezu ausschließlich von Leckleitfähigkeiten verursacht wird.

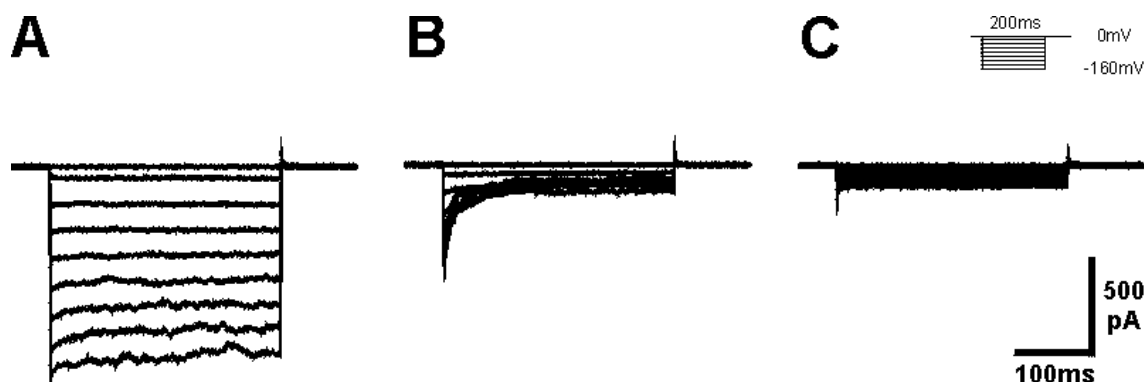


Abbildung 15 Kaliumeinwärtsströme ruhender Mikroglia bei einem Haltepotential von 0 mV in natriumfreier Extrazellulärlösung (Darstellung nicht leaksubtrahiert); A-Einwärtsströme auf 200 ms lange hyperpolarisierende Pulse von 0 bis -160 mV in 20 mV Schritten; B-durch dasselbe Pulsprotokoll ausgelöste Einwärtsströme nach Superfusion mit 0,1 mM Ba^{2+} ; C-Strommessung nach Superfusion mit 1 mM Ba^{2+}

Diese Beobachtung konnte sowohl für Mikrogliazellen unter Kontrollbedingungen ($n=10$) als auch nach eintägiger Inkubation mit ACM ($n=5$) bestätigt werden.

3.6 Detaillierte Beschreibung des durch $\text{TGF-}\beta$ induzierten Kaliumauswärtsstromes I_{DR}

Die gravierendste Veränderung im Kaliumstrommuster nach Inkubation von Mikroglia mit ACM bzw. $\text{TGF-}\beta$ war, wie in Kapitel 3.3 und 3.4 ausgeführt wurde, das in Häufigkeit und Amplitude verstärkte Auftreten eines Kaliumauswärtsstromes. Da Astrozyten die Isoformen 1-3 von $\text{TGF-}\beta$ sezernieren können, wurde überprüft, ob die Hochregulation der Auswärtsströme isoform-spezifischen Veränderungen unterworfen ist.

3.6.1 Vergleich der Stromdichten

Die Mikrogliazellen wurden zur Ermittlung der Stromdichte I_p in der Ganzzellkonfiguration mit den Lösungen L_{int} und L_{exNa} gemessen. Ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV wurden die Zellen alle 30 s für 200 ms von -60 mV bis $+30$ mV mit einem Inkrement von 10 mV depolarisiert.

In Abbildung 16A ist eine Stromregistrierung für eine Kontrollzelle gegeben, bei der für die grafische Darstellung die Leckleitfähigkeiten abgezogen wurden. Bei Depolarisation konnte kein Stromfluß festgestellt werden. Im Vergleich dazu wurde bei Mikrogliazellen, die für einen Tag mit TGF- β 1 (Abbildung 16B) oder TGF- β 2 (Abbildung 16C) kultiviert wurden, auf depolarisierende Pulse ab einem Schwellenpotential von -30 mV ein Strom aktiviert, der sich durch eine schnelle Aktivierung und eine langsame Inaktivierung auszeichnete. Die Aktivierungs- als auch die Inaktivierungsprozesse wurden mit zunehmendem Potential schneller, wobei für die Inaktivierung jenseits von 0 mV keine größeren Veränderungen mehr stattfanden.

Zur Objektivierung der Beobachtungen und für die statistischen Analyse wurden die Stromdichten der K^+ -Ströme bei $+30$ mV ermittelt. Die Mittelwerte sind in Abbildung 16D dargestellt. Bei den Kontrollzellen ergab sich für den Auswärtsstrom eine mittlere Stromdichte von $4,6 \pm 0,7 \mu A/cm^2$ ($n=44$). Eine deutliche Steigerung der mittleren Auswärtsstromdichte zeigte sich bei den Zellen, die mit 10 ng/ml TGF- β 1 kultiviert wurden; hier lag bei $n=56$ ein Mittelwert von $31,8 \pm 6,1 \mu A/cm^2$ vor, was sich in Student's t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p<0,001$ als verschieden von der Kontrollpopulation erwies. Auch für die Zellen, die mit 10 ng/ml TGF- β 2 inkubiert wurden, konnte eine Steigerung der mittleren Stromdichte auf $20,6 \pm 4,4 \mu A/cm^2$ ($n=9$) festgestellt werden; das Signifikanzniveau gegenüber der Kontrolle lag im t-Test bei $p<0,01$. Der Unterschied zwischen der Stromdichte nach Inkubation mit TGF- β 1 und TGF- β 2 erwies sich in Student's t-Test mit $p>0,1$ als nicht signifikant.

Da sich hinsichtlich des induzierten Stromes keine Hinweise ergaben, daß sich das Expressionsverhalten der Mikrogliazellen nach Stimulation mit TGF- β 2 von dem nach Stimulierung mit TGF- β 1 unterscheidet, wurde die weitere Charakterisierung des induzierten Auswärtsstromes mit der Isoform 1 von TGF- β vorgenommen.

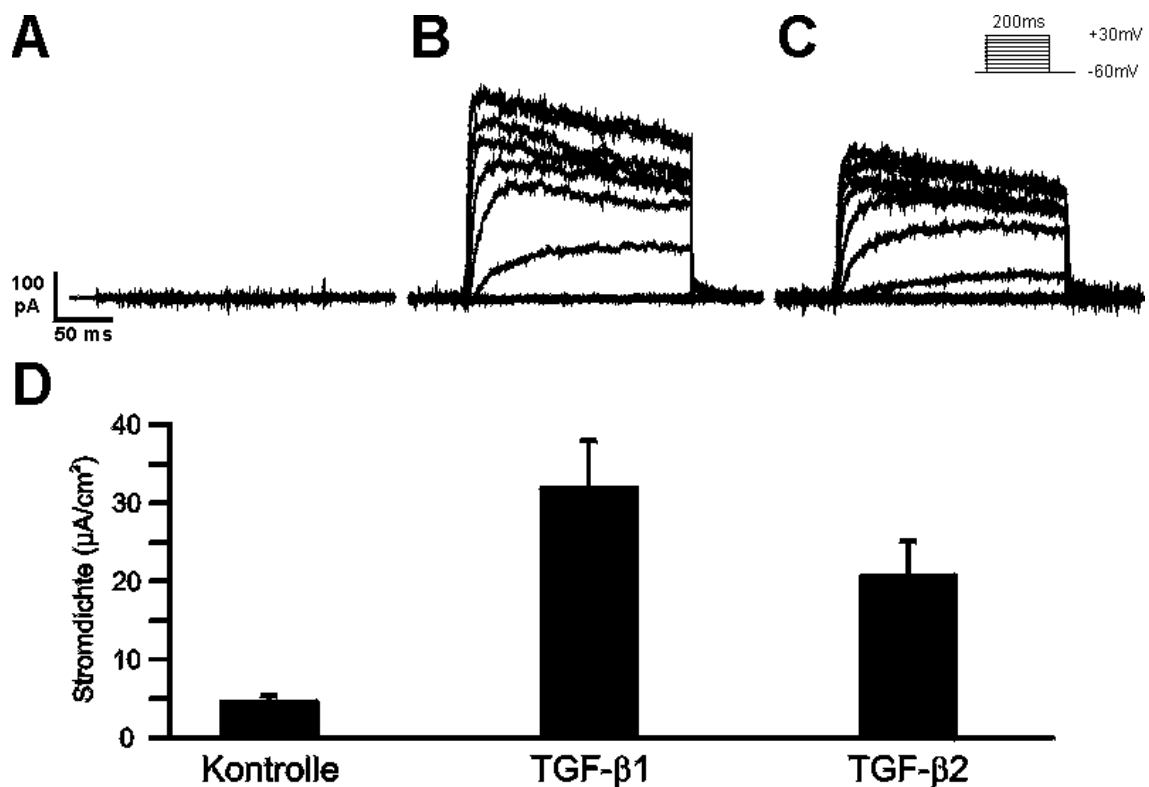


Abbildung 16 Hochregulation der Kaliumauswärtsströme an Mikrogliazellen durch TGF- β ; A-leaksubtrahierte Darstellung der Stromantwort auf depolarisierende Pulse bei Kontrollzellen; B-Auftreten eines Auswärtsstromes nach eintägiger Inkubation mit 10 ng/ml TGF- β 1; C- I_{DR} nach Kultivierung mit 10 ng/ml TGF- β 2 für einen Tag; D-Vergleich der mittleren Stromdichten bei +30 mV für die in A-C genannten Bedingungen

3.6.2 Kinetische Charakteristika des Kaliumauswärtsstromes

Um die kinetischen Eigenschaften des Auswärtsstromes zu bestimmen, wurden, wie bei der Bestimmung der Stromdichten, die Mikrogliazellen in der Ganzzellkonfiguration der Patch-clamp-Technik mit den Lösungen L_{int} und L_{exNa} gemessen. Das Potential, auf das die Zellen nach Etablierung der Ganzzellkonfiguration geklemmt wurden, betrug wiederum -60 mV.

3.6.2.1 zeitabhängiges Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten

Zur Determination der zeitabhängigen Eigenschaften des Kaliumauswärtsstromes wurden die Mikrogliazellen mit einer Frequenz von 0,03 Hz zwischen -60 mV und $+30$ mV in 10 mV Schritten depolarisiert. Die Zeitspanne der Pulse zur Bestimmung der Aktivierungskinetik betrug 200 ms.

Ein Beispiel für die spannungsabhängigen Veränderungen der Aktivierungskinetik ist in Abbildung 17A wiedergegeben. Dargestellt sind die Rohdatenpunkte der Strommessung auf

depolarisierende Pulse von -30 mV, 0 mV bzw. $+30$ mV. Hinzugefügt wurden die theoretisch nach dem Hodgkin-Huxley-Modell ermittelten Kurvenverläufe entsprechend Gleichung 3, die den besten Fit für den zeitlichen Verlauf des Auswärtsstromes ergaben. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Aktivierung bei positiveren Potentialen schneller ist, was durch eine geringere Zeitkonstante repräsentiert wird.

Die mittleren Aktivierungszeitkonstanten (τ_n) der Kaliumauswärtsströme von 22 Versuchen sind in Abbildung 17B gegen das angelegte Potential dargestellt. Bei einem Potential von -30 mV wurde eine Zeitkonstante von $14,5 \pm 2,2$ ms ermittelt. Im Vergleich dazu war τ_n mit $3,5 \pm 0,3$ ms bei -10 mV drastisch reduziert; bei Potentialen über 0 mV änderte sich die Zeitkonstante der Aktivierung nur noch unwesentlich (bei $+30$ mV: $1,3 \pm 0,2$ ms).

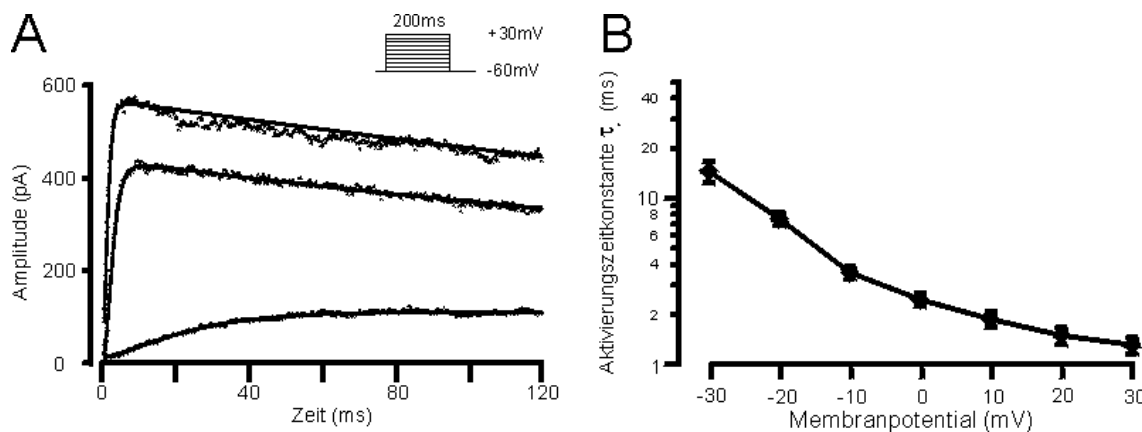


Abbildung 17 Bestimmung der Aktivierungszeitkonstanten des durch TGF- β induzierten Auswärtsstromes unter Annahme des Hodgkin-Huxley-Modells; A-Beispiel für die Stromantworten einer Mikrogliazelle auf depolarisierende Pulse von -30 , 0 und $+30$ mV, der Fit der Datenpunkte entsprechend der HH- n^{4j^1} -Kinetik wird von den durchgezogenen Linien veranschaulicht; B-Darstellung der mittleren Aktivierungszeitkonstanten τ_n als Funktion des applizierten Potentials in semilogarithmischer Skalierung

Für die Ermittlung der Inaktivierungskinetik wurden die Potentiale für 2000 ms über der Zellmembran angelegt. In Abbildung 18A sind typische Kurvenverläufe für die zeitabhängige Inaktivierung des Kaliumauswärtsstromes als Punktdiagramm für Potentiale von -10 mV, $+10$ mV sowie $+30$ mV wiedergegeben, wobei die Aktivierung des Stromes zwecks besserer Übersichtlichkeit herausgenommen wurde. Die durchgezogenen Linien entsprechen den grafischen Darstellungen von Funktionen, die nach dem Hodgkin-Huxley-Modell mit einer n^{4j^1} -Kinetik den Datenpunkten angepaßt wurden. Man erkennt, daß sich die Inaktivierung bei $+10$ mV und $+30$ mV nur unwesentlich unterscheidet; im Vergleich dazu ist sie bei -10 mV wesentlich langsamer, was einer größeren Zeitkonstante entspricht.

Um diese Beobachtung statistisch zu untermauern, wurden die mittleren Inaktivierungszeitkonstanten (τ_j) von 13 Zellen bestimmt und in Abbildung 18B dargestellt. Es wird deutlich, daß die zeitabhängige Inaktivierung bei einem Potential von -20 mV mit einer Zeitkonstante von 1641 ± 470 ms wesentlich langsamer ist als bei 0 mV mit τ_j von 640 ± 53 ms. Positiv von 0 mV verändert sich die Zeitkonstante der Inaktivierung nur noch unerheblich; bei einem Potential von $+30$ mV beträgt ihr Wert 581 ± 40 ms.

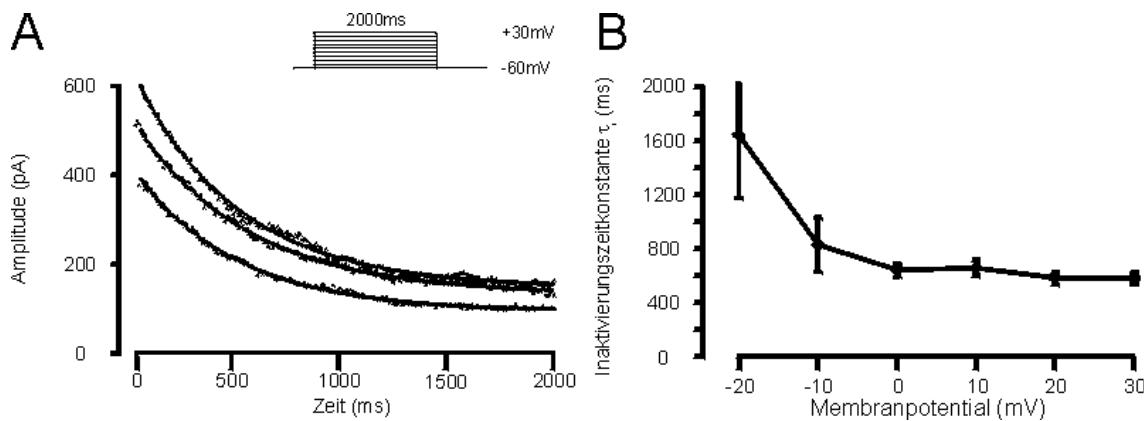


Abbildung 18 Auswertung der zeitabhängigen Inaktivierung des von TGF- β ausgelösten I_{DR} mit Hilfe des Hodgkin-Huxley-Modells (siehe auch Gleichung 3); A-Veranschaulichung der Inaktivierung des Auswärtsstromes bei Potentialdifferenzen von -10 , $+10$ und $+30$ mV, Darstellung der Rohdaten und der angefitteten Kurven des HH-Modells; B-Abnahme der mittleren Inaktivierungszeitkonstante in Relation zum angelegten Potential

3.6.2.2 Steady-state Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten

Zur Bestimmung des Aktivierungsverhaltens des Kaliumauswärtsstromes wurden die Mikrogliazellen von -60 mV bis $+30$ mV in einem zeitlichen Abstand von 30 s depolarisiert. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 19A gezeigt. Erstmals aktiviert der Strom bei einem Potential von -30 mV, die Spitzenstromwerte vergrößern sich mit zunehmender Depolarisation.

Aus den gemessenen Amplituden wurden gemäß Gleichung 4 mit dem nach der Nernst-Gleichung theoretisch ermittelten Kaliumumkehrpotential von $-80,2$ mV die Leitfähigkeiten ermittelt und auf den Maximalwert normalisiert. Die Mittelwerte von 19 Messungen werden in Abbildung 19C als Funktion der Potentialdifferenz durch Quadrate repräsentiert und entsprechend Gleichung 5 (siehe Seite 31) an eine Boltzmannfunktion angepaßt. Es ergab sich ein halbmaximales Aktivierungspotential von $-26,9$ mV mit einer Steigung von $k=4,6$ mV.

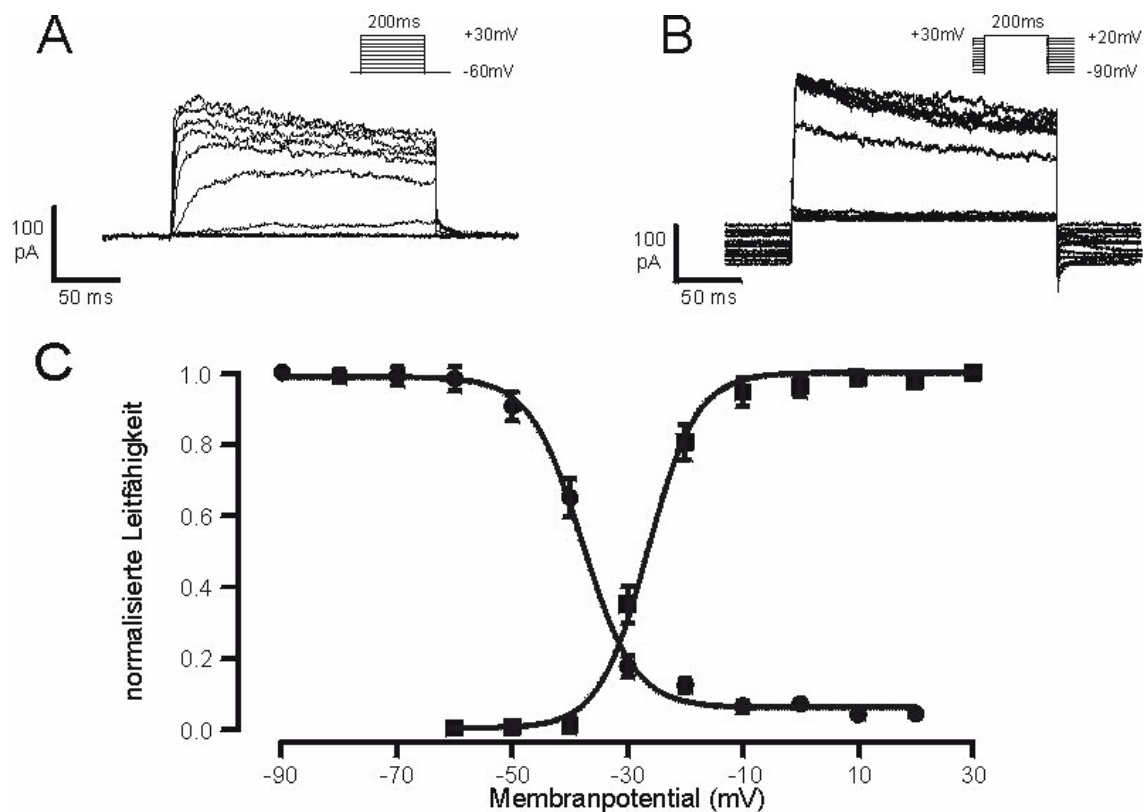


Abbildung 19 Aktivierungs- und steady-state Inaktivierungsverhalten des durch TGF- β 1 an Mikroglia induzierten Kaliumauswärtsstromes; A-Aktivierung des Stromes ausgehend von einem Haltepotential von -60 mV durch depolarisierende Pulse; B-Inaktivierung des durch eine Depolarisation auf $+30$ mV ausgelösten Stromes bei stufenweiser Änderung des Haltepotentials von -90 mV auf $+20$ mV; C-Anpassung der normalisierten Leitfähigkeiten der Aktivierungskurve (Quadratrate) bzw. der Inaktivierungskurve (Punkte) an eine Boltzmannfunktion

Das Inaktivierungsverhalten im steady-state wurde durch 200 ms lange Pulse auf $+30$ mV bestimmt, wobei das Haltepotential zwischen -90 und $+20$ mV variiert wurde. Eine derartige Messung ist in Abbildung 19B gezeigt. Die bei den verschiedenen Haltepotentialen ausgelösten Kaliumauswärtsströme sind bis zu -50 mV nahezu konstant, verringern sich in ihrer Amplitude bei positiveren Haltepotentialen und sind ab einem Potential von -10 mV nicht mehr meßbar. Die Mittelwerte der auf die Maximalwerte normalisierten Stromamplituden von 13 Experimenten sind in Abbildung 19C als Punkte dargestellt. Dieser Inaktivierungskurve konnte eine Boltzmannfunktion mit den Parametern $V_H = -37,9$ mV und einer Steigung von $-4,6$ mV angepaßt werden.

3.6.2.3 frequenzabhängiges Verhalten des I_{DR}

Ein Merkmal verschiedener Kaliumkanäle ist eine kumulative Inaktivierung bei repetitiver Depolarisation, die durch eine C-Typ Inaktivierung, d.h. durch einen Verschluß der äußeren Kanalpore, erklärt wird (Yellen et al. 1994). Dieser kumulative Effekt ist stark von der Frequenz abhängig, mit welcher die Zelle depolarisiert wird. Um diese Eigenschaft an dem durch TGF- β induzierten Kaliumauswärtsstrom zu untersuchen, wurden die Mikrogliazellen von einem Haltepotential von -60 mV ausgehend für 200 ms auf $+30$ mV depolarisiert. Die Stromantworten auf die Depolarisation wurden mit einer Frequenz von 1 Hz aufgezeichnet.

Ein Beispiel für eine derartige Messung ist in Abbildung 20A wiedergegeben. Es wird deutlich, daß die Amplitude bis zum zehnten Puls kontinuierlich abnimmt, während bei weiterer Depolarisation nur noch eine geringfügige Veränderung der ausgelösten Ströme zu beobachten ist. Die Stromamplituden wurden auf diejenigen der ersten Messung normalisiert und die Mittelwerte aus 17 Experimenten als Funktion der Pulsanzahl, und somit der Zeit, in Abbildung 20B dargestellt. Bereits nach fünf Sekunden wurde im Durchschnitt nur noch eine halbmaximale Amplitude gemessen ($0,51 \pm 0,02$); nach 10 s verringerte sich die Amplitude nur noch geringfügig und lag nach 30 s bei einem normalisierten Wert von $0,29 \pm 0,03$. Die ermittelten relativen Werte ließen sich am besten durch eine biexponentielle Funktion beschreiben, die durch zwei Zeitkonstanten von $1,61$ s und $20,5$ s determiniert ist.

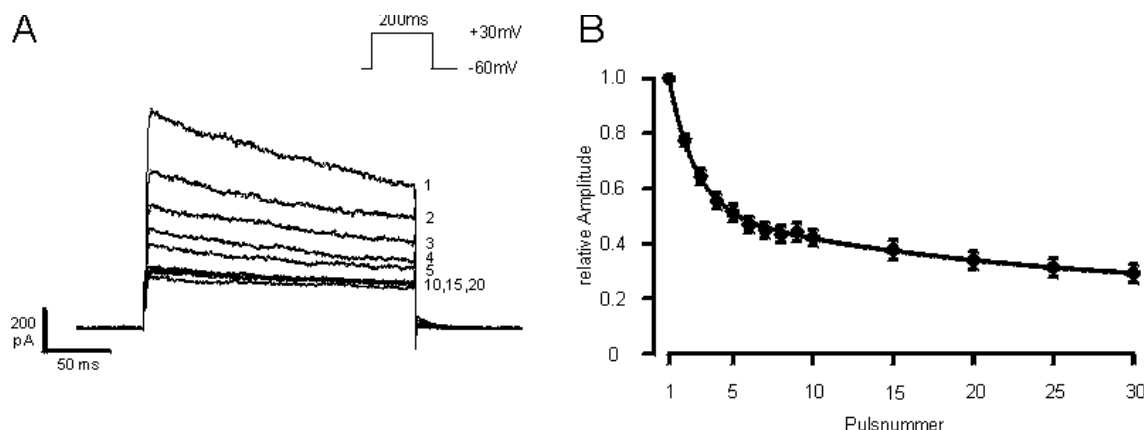


Abbildung 20 Abnahme der Stromamplitude bei repetitiver Depolarisation muriner Mikroglia; A-Beispiel für die Amplitudenverminderung des I_{DR} bei wiederholtem Auslösen des Stromes, die Zahlen rechts neben den Kurven entsprechen der Pulsnummer, der zeitliche Abstand zwischen zwei Pulsen betrug 1 s; B-Mittelwerte der normalisierten Amplituden als Funktion der Pulsnummer ($n=17$), zusätzlich ist eine biexponentielle Funktion den Werten angepaßt worden

3.6.3 Ermittlung der pharmakologischen Eigenschaften des induzierten Kaliumauswärtsstromes

Zur weitergehenden Charakterisierung des Kaliumauswärtsstromes (I_{DR}), der durch TGF- β 1 an Mikrogliazellen induziert wird, wurden die pharmakologischen Beeinflussungsmöglichkeiten der Auswärtsströme untersucht. Von einer Vielzahl unterschiedlicher Peptidtoxine, die meist aus Tiergiften gewonnen wurden, ist mittlerweile bekannt, daß sie verschiedene Kanäle blockieren können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Charybdotoxin, Kaliotoxin und α -Dendrotoxin auf den nach TGF- β -Stimulation auftretenden I_{DR} analysiert.

Die Auswärtsströme wurden in der Ganzzellkonfiguration mit den Lösungen L_{int} und L_{exNa} gemessen. Der extrazellulären Lösung wurde 0,1 % Albumin (BSA) als Transportprotein für die Toxine zugegeben. Die Peptidgifte können nur den im aktivierten Zustand befindlichen Ionenkanal durch Bindung an die äußere Pore blockieren (sogenannte Offenkana blocker); deshalb wurden die Mikrogliazellen vom Haltepotential von -60 mV repetitiv für 200 ms auf $+30$ mV depolarisiert. Wegen der nachgewiesenen frequenzabhängigen Inaktivierung (siehe 3.6.2.3) wurde der Abstand zwischen zwei Depolarisationen auf 30 s festgelegt. Nach Erreichen einer stabilen Amplitude wurde bei Superfusion mit den Peptidtoxinen eine Stromamplitudenreduktion sichtbar; der Effekt wurde als prozentuale Abnahme gegenüber der Kontrolle ausgewertet.

Charybdotoxin (CTX) bewirkte, wie es in Abbildung 21A dargestellt ist, an Kaliumauswärtsströmen bei einer Konzentration von 1 nM eine halbmaximale Blockierung. Bei acht Experimenten konnte eine relative Amplitudenverminderung auf $40,0 \pm 8,7$ % ermittelt werden. Diese Inhibition der Ströme wurde bei 100 nM gesteigert, hier betrug der in Bezug auf die Kontrolle prozentuale Reststrom $12,3 \pm 3,5$ %. In Student's t-Test waren diese Resultate auf einem Niveau von $p < 0,001$ signifikant verschieden.

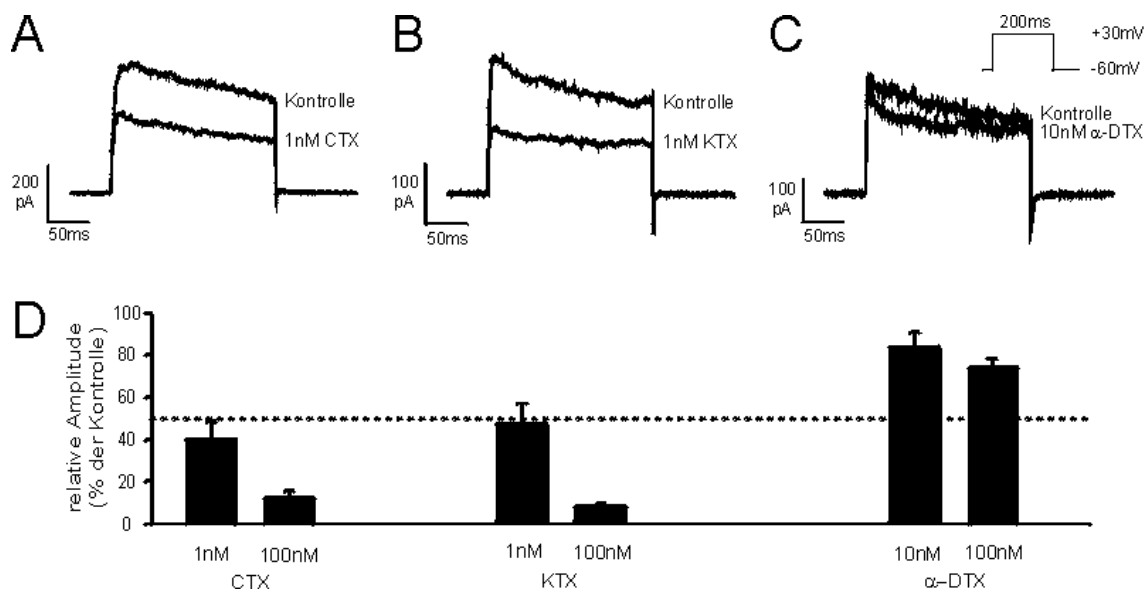


Abbildung 21 Wirkung verschiedener Peptidtoxine auf den nach Inkubation mit TGF- β 1 exprimierten Kaliumauswärtsstrom muriner Mikroglia; A-Reduktion der Amplitude nach Superfusion mit 1 nM Charybdotoxin; B-Amplitudenverminderung des I_{DR} durch 1 nM Kaliotoxinlösung; C-geringfügige Verkleinerung der Amplitude durch 10 nM α -Dendrotoxin; D-Mittelwerte der Amplitudenabnahme nach Superfusion mit CTX (n=8), KTX (n=8) und α -DTX (n=13), die gestrichelte Linie repräsentiert eine Reduktion auf die Hälfte des Kontrollwertes

In Abbildung 21B wird der Effekt von 1 nM Kaliotoxin (KTX) auf den I_{DR} gezeigt. In Analogie zu CTX konnte eine Beeinflussung der Amplitude ohne erkennbare Veränderung der kinetischen Eigenschaften beobachtet werden. In acht Messungen betrug bei einer Konzentration von 1 nM KTX die mittlere Amplitudenreduktion $46,3 \pm 9,6 \%$, während bei 100 nM KTX nur noch eine Amplitude von $6,9 \pm 1,6 \%$ zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse ergaben in Student's t-Test ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Peptiden hatte α -Dendrotoxin (α -DTX) nur geringfügige Wirkungen auf den durch TGF- β 1 induzierten Auswärtsstrom, wie man in Abbildung 21C und D erkennen kann. Bei Superfusion mit 10 nM α -DTX betrug in 13 Versuchen die mittlere Reduktion der Amplitude $83,0 \pm 8,1 \%$. Im t-Test stellte dieses Ergebnis auf einem Niveau von $p = 0,05$ keine signifikante Änderung dar. Das Einwaschen einer Lösung mit einer Konzentration von 100 nM Dendrotoxin ergab einen Rückgang der Amplituden auf $72,5 \pm 7,4 \%$; in Student's t-Test konnte hierfür ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ ermittelt werden.

3.6.4 Untersuchungen zur intrazellulären Signalkaskade der Induktion des I_{DR} durch TGF- β

Es gibt aus anderen Arbeiten einige Hinweise darauf, daß verschiedene Proteinkinasen an einer posttranslationalen Modifikation von Kanalproteinen beteiligt sein können. Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob die Induktion des Kaliumauswärtsstromes durch TGF- β auf die Wirkung von Proteinkinasen angewiesen ist.

3.6.4.1 Untersuchungen zur Induzierbarkeit von Kaliumauswärtsströmen mit Aktivatoren von Proteinkinasen

Aus der Literatur sind verschiedene Untersuchungen bekannt, die nach Stimulation der Proteinkinase A (PKA) oder C (PKC) eine Aktivierung des Kaliumauswärtsstromes in Mikrogliazellen nachweisen konnten.

Deshalb wurde in einem Teil der Experimente der Frage nachgegangen, ob die Stimulation der Proteinkinase C mit Phorbolmyristatazetat (PMA) allein genügt, um eine Induktion des Kaliumauswärtsstromes zu erreichen. Die in diesem Experiment ermittelte Stromdichte für die 11 Mikrogliazellen der Kontrollgruppe lag bei $5,2 \pm 0,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Für die 20 Zellen, denen für 24 Stunden 10-100 nM PMA in das Kulturmedium gegeben wurde, konnte ein Wert von $5,0 \pm 0,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ermittelt werden (siehe Abbildung 22). Dies war im t-Test mit $p > 0,5$ kein signifikanter Unterschied.

Ferner wurde untersucht, ob durch Stimulation der Proteinkinase A mit einer membranpermeablen Form des cAMP, dem Dibutyryl-cAMP (dBcAMP), eine Veränderung in der mittleren Stromdichte des I_{DR} erreicht werden kann. Der Stromdichtenmittelwert bei der unbehandelten Kontrollgruppe wurde für $n=11$ mit $2,0 \pm 0,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ berechnet und in Abbildung 22 dargestellt.

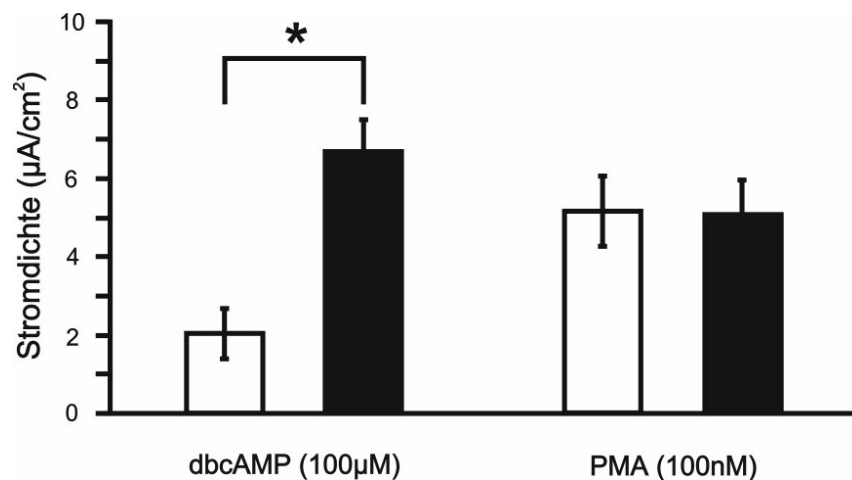


Abbildung 22 Veränderungen der mittleren Stromdichte des I_{DR} durch Aktivatoren der Proteinkinase A (dBcAMP) oder der Proteinkinase C (PMA); offene Balken – Kontrolle, geschlossene Balken – Proteinkinaseaktivatoren

Im Vergleich dazu lag der Wert bei 20 Zellen, die einen Tag lang mit 10-100 µM dBcAMP kultiviert wurden, bei $6,6 \pm 0,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Obwohl sich die Stromdichtenwerte im t-Test auf einem Niveau von $p < 0,001$ unterscheiden, ist die mittlere Stromdichte im Vergleich zu den Werten, die nach Inkubation mit TGF- β 1 erreicht werden, merklich niedriger.

3.6.4.2 Einfluß des Proteinkinaseinhibitors H7 auf die Induktion der Kaliumauswärtsströme

Da eine Beeinflussung der Stromdichte des Kaliumauswärtsstromes durch Proteinkinaseaktivatoren nachgewiesen werden konnte, wurde in einem weiteren Teil der Experimente mit 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H7) ein Inhibitor gewählt, der eine Vielzahl von Serin/Threonin-Proteinkinasen hemmt. Eine halbe Stunde vor Zugabe von TGF- β wurde der Proteinkinaseinhibitor H7 den Kulturen hinzugefügt, um bei Bindung von TGF- β an den zellulären Rezeptor bereits eine ausreichende intrazelluläre Konzentration vorliegen zu haben. Nach 24 Stunden wurden die Amplituden der Kaliumauswärtsströme, wie in 3.6.1 beschrieben, ermittelt und anschließend die Stromdichten für ein Potential von +30 mV errechnet.

In den Kontrollexperimenten, bei denen die Mikrogliazellen mit 10 ng/ml TGF- β 1 für 24 Stunden inkubiert wurden, ergab sich mit $18,5 \pm 6,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=6$) eine der in Kapitel 3.6.1 vergleichbare Stromdichte. Bei Zugabe des Inhibitors H7 in einer Konzentration von 100 µM war die mittlere Stromdichte für $n=11$ Zellen mit $1,6 \pm 0,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ nach Stimulation mit TGF- β 1 drastisch reduziert ($p < 0,05$; siehe Abbildung 23). Offensichtliche Veränderungen in der Kinetik der Auswärtsströme konnten nach Inkubation mit H7 nicht beobachtet werden.

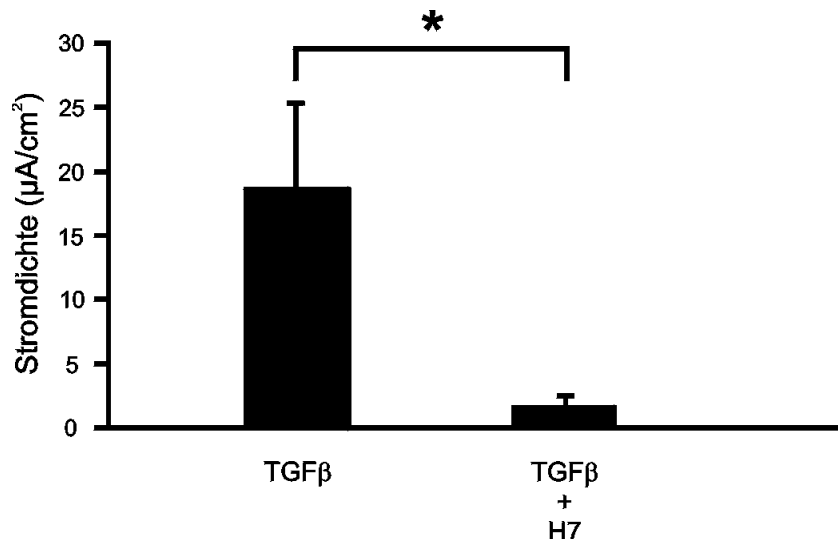


Abbildung 23 Effekt von H7 auf die mittlere Stromdichte der Kaliumauswärtsströme nach Stimulation mit TGF-β1

3.6.4.3 Beeinflussung der TGF-β-induzierten Auswärtsströme durch Inhibitoren von Proteinkinasen

Ein Einfluß von Proteinkinasen bei der intrazellulären Vermittlung des TGF-β-Signals konnte nach den Ergebnissen des vorigen Kapitels angenommen werden. Deshalb kamen spezifischere Blocker von Proteinkinasen zum Einsatz.

In einem Teil der Experimente wurde vor der Zugabe von 10 ng/ml TGF-β1 ein myristoyliertes Peptid, das mit der Aminosäuresequenz 14-22 als Pseudosubstrat an der Proteinkinase A wirkt, dem Medium in einer Konzentration von 10-20 μM beigegeben. Bei der Kontrollpopulation, die für einen Tag nur mit TGF-β1 kultiviert wurde, konnte bei 22 Zellen eine Stromdichte von $10,4 \pm 1,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ermittelt werden, wie es in Abbildung 24 dargestellt ist. Der Inhibitor der PKA verringerte die mittlere Stromdichte in n=34 Mikrogliazellen auf $8,7 \pm 1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. Dieser geringfügige Unterschied wurde im t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,1$ als nicht wesentlich bewertet.

In Analogie zu den Untersuchungen bezüglich der PKA wurde in weiteren Versuchen die PKC mit einem myristoylierten Peptid gehemmt, das der Sequenz 19-27 des Substrates der PKCα/β entspricht. In der nur mit TGF-β kultivierten Kontrolle wurde für 18 Mikrogliazellen eine mittlere Stromdichte von $16,7 \pm 5,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ermittelt (siehe Abbildung 24). Der entsprechende Wert bei Zugabe von 10 μM PKC-Inhibitor wurde mit $11,4 \pm 2,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (n=20) berechnet.

Auch dieser Unterschied wurde in Student's t-Test mit $p > 0,1$ als nicht signifikante Änderung der Stromdichte abgelehnt.

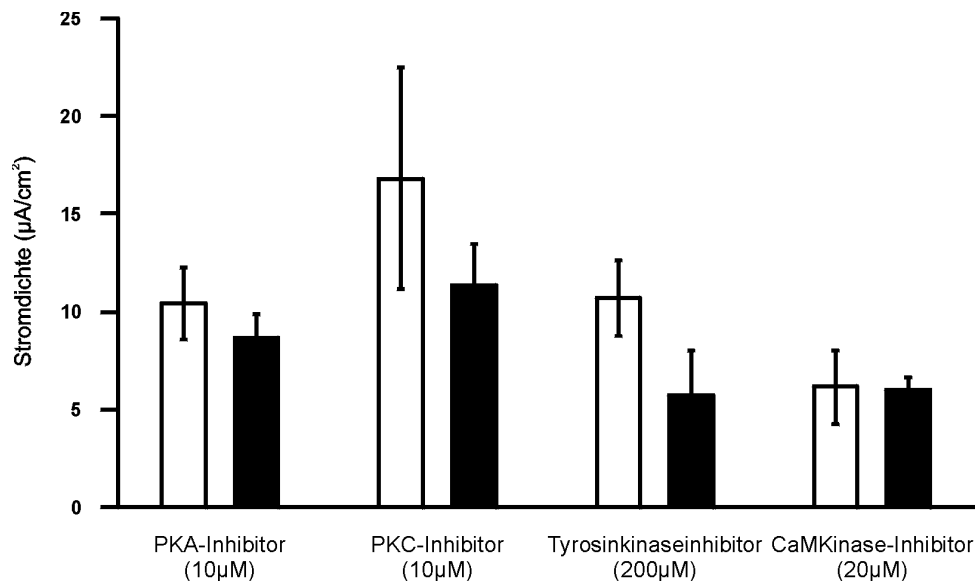


Abbildung 24 Änderung der mittleren Stromdichte von durch TGF- β induzierten Kaliumauswärtsströmen nach Zugabe von spezifischen Proteinkinaseinhibitoren; offene Balken – 10 ng/ml TGF- β ; geschlossene Balken – 10 ng/ml TGF- β + Proteinkinaseinhibitor

Weitere Experimente wurden mit dem Proteintyrosinkinaseinhibitor Genistein durchgeführt, der für 24 Stunden in einer Konzentration von 200 μM hinzugegeben wurde. Die Kontrollgruppe, die nur TGF- β ausgesetzt war, wies in 15 Zellen eine mittlere Stromdichte von $10,6 \pm 2,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf (siehe Abbildung 24). Demgegenüber betrug die Stromdichte des Kaliumauswärtsstromes $5,8 \pm 2,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ in der mit Genistein inkubierten Gruppe ($n=15$). Das mit dem t-Test ermittelte Signifikanzniveau betrug $p > 0,1$. Deshalb muß der Unterschied als nicht signifikante Änderung eingeschätzt werden.

Ein weiteres Experiment beschäftigte sich mit der Rolle der Calmodulinkinase bei der Induktion des Kaliumauswärtsstromes durch TGF- β . Dazu wurde den Mikroglia-kulturen KN-93, ein Inhibitor der Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Proteinkinase Typ II (CaMKII), in einer Konzentration von 10-20 μM zugesetzt. Die Kontrollpopulation hatte eine Stromdichte von $6,1 \pm 1,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=6$). Für die mit KN-93 kultivierte Gruppe wurde in 14 Mikrogliazellen eine mittlere Stromdichte von $6,0 \pm 0,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ berechnet (siehe Abbildung 24). Die ermittelte Differenz in der Stromdichte wurde in Student's t-Test mit $p > 0,5$ als nicht signifikant bewertet.

4 Diskussion

4.1 Deaktivierung der Mikrogliazellen mit ACM

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand eines Zellkulturmodells morphologische, immunologische und elektrophysiologische Charakteristika muriner Mikroglia studiert. Dabei lag ein Schwerpunkt auf der Untersuchung, inwieweit diese verschiedenen Parameter den Deaktivierungszustand der Zellen widerspiegeln können und ob sie sich zeitgleich oder versetzt im Deaktivierungsprozeß verändern. Dazu war es notwendig, ein Modell für die Deaktivierung der Mikroglia zu etablieren und zu verifizieren. Ein derartiges Modell wurde mit der Exposition von Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) auf Mikrogliazellen gefunden.

Zur Bestätigung des Deaktivierungsprozesses können verschiedene Meßgrößen herangezogen werden, die sich im Verlaufe von Aktivierungs-/Deaktivierungsprozessen verändern. In der Literatur werden als Maß für einen geänderten Aktivierungszustand folgende Parameter untersucht:

- die Auswertung von Ramifikationsindizes (Wilms et al. 1997)
- die Regulation von Adhäsionsmolekülen wie MHC, ICAM, LFA oder Selektinen (Hailer et al. 1996)
- die Produktion freier Sauerstoff- oder Stickstoffradikale (Tanaka et al. 1998)
- die Aktivitäten verschiedener Enzyme (Suzumura et al. 1991)
- die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ oder TGF- β (Suzumura et al. 1996)
- die Proliferation der Mikrogliazellen (Jones et al. 1998)
- das Auftreten eines Kaliumauswärtsstromes (Nörenberg et al. 1992)

Um den Nachweis zu erbringen, daß Mikrogliazellen *in vitro* mit ACM in einen deaktivierten Zustand überführt werden können, wurden die Ramifikationsindizes (RI) der Zellen, das Expressionsniveau von LFA-1, ICAM-1 und MHC Klasse II sowie das Kaliumstrommuster der Mikroglia untersucht.

Nach 24 Stunden in Kultur mit ACM hatten die Mikrogliazellen bereits einen Morphologie-wandel durchlaufen, der sich aufgrund der zunehmenden Ramifizierung im Vergleich zur Kontrollgruppe in einer Verminderung des RI auf die Hälfte ausdrückte. Dieser Prozeß entwickelte sich nach fünf Tagen nur geringfügig, aber statistisch signifikant weiter. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen, in denen eine Ramifizierung von Mikroglia (Suzumura et al. 1991) oder Monozyten (Sievers et al. 1994) mit Astrozyten-

konditioniertem Medium ausgelöst werden konnten. Zum gleichen Ergebnis kommen verschiedene Autoren, die morphologische Veränderungen von Mikrogliazellen in Kokultur mit Astrozyten untersuchten (Wilms et al. 1997). Diese Untersuchungen sind für die Fragestellung, ob lösliche Faktoren die Ramifizierung auslösen können, jedoch schwieriger zu interpretieren. So konnten ebenfalls mit Methanol fixierte Astrozyten, die nicht mehr zur Produktion entsprechender Zytokine befähigt sind, eine Ramifizierung induzieren (Tanaka & Maeda 1996, Wilms et al. 1997), woraus die Autoren schlußfolgerten, daß es sich um astrozytäre Zellbestandteile handeln muß, die eine Ramifizierung der Mikroglia auslösen.

Die Untersuchung der Expression von MHC Klasse II, LFA-1 und ICAM-1 bewies übereinstimmend für alle immunologischen Marker, daß diese nach fünftägiger ACM-Inkubation etwa auf die Hälfte des Kontrollniveaus herunterreguliert wurden. Dieses Ergebnis wird als ein deutliches Zeichen der Deaktivierung von Mikrogliazellen angesehen. Eine ähnliche Herunterregulierung von MHC- und Adhäsionsmolekülen wurde bereits für Mikroglia in organotypischen Hippokampuskulturen beschrieben (Hailer et al. 1996, Heppner et al. 1998, Hailer et al. 1998). Analog dazu wurde in Mikroglia-kulturen, die mit IFN- γ aktiviert wurden, eine vermehrte Expression von MHC mRNA (O'Keefe et al. 1999, Hellendall & Ting 1997), von ICAM-1 mRNA (Shrikant et al. 1995) sowie von immunhistochemisch nachgewiesenem MHC und LFA-1 (Grau et al. 1997) gezeigt.

Bei der Analyse des Expressionsmusters von spannungsaktivierten Kaliumkanälen konnte 24 Stunden nach Zugabe von ACM ein im Vergleich zur Kontrolle erhöhter Anteil von Zellen ermittelt werden, die einen Kaliumauswärtsstrom aufwiesen. Der Prozentsatz von Zellen, die über einen Einwärtsstrom verfügten, blieb jedoch unverändert. In der ersten elektrophysiologischen Arbeit an Mikroglia wurde von Kettenmann und Mitarbeitern (Kettenmann et al. 1990) die Vermutung ausgesprochen, daß Mikroglia sich von Makrophagen durch die Abwesenheit von Kaliumauswärtsströmen unterscheidet. In späteren Arbeiten wird das Auftreten eines Kaliumauswärtsstromes als Zeichen einer Aktivierung angesehen. Das Auftreten eines K⁺-Auswärtsstromes wurde nach Stimulation der Mikroglia mit bakteriellem Lipopolysaccharid (Nörenberg et al. 1992), IFN- γ , GM-CSF (Fischer et al. 1995) sowie Zellwandbestandteilen von *Streptococcus pneumoniae* (Draheim et al. 1999) beobachtet. Da es sich bei diesen Substanzen um Immunaktivatoren der Mikroglia handelt, wurde angenommen, daß es sich bei dem Auftreten des Auswärtsstromes um ein Aktivierungszeichen handelt. Die Allgemeingültigkeit dieser Vermutung muß aufgrund der durch die Morphologie sowie die immunologischen Marker gezeigten Deaktivierung der Mikrogliazellen abgelehnt werden. Zumindest in dem verwendeten

Zellkulturmodell geht das Auftreten von Kaliumauswärtsströmen nicht notwendigerweise mit einem aktivierten Zustand der Mikroglia einher.

Warum das Auftreten der Kaliumauswärtsströme nach Zugabe von ACM nur transient zu beobachten ist, kann nicht definitiv beantwortet werden. Möglicherweise spielen für dieses Phänomen Effekte eine Rolle, die eine negative Rückkopplung auslösen, zum Beispiel über die Regulation intrazellulärer Signaltransduktoren. Dem widerspricht allerdings die Tatsache, daß bei täglicher ACM-Zugabe weiterhin der Kaliumauswärtskanal hochreguliert bleibt. Eher könnte ein Verlust des im ACM enthaltenen Faktors verantwortlich sein; denkbar wäre eine verminderte Aktivierung der latenten Form von TGF- β oder die proteolytische Spaltung von TGF- β durch Enzyme, die von Mikrogliazellen in das Kulturmedium sezerniert werden, sowie die Veränderung des TGF-Proteins im Inkubatormilieu.

4.2 Identifikation der für die morphologischen Veränderungen verantwortlichen Zytokine

In dem verwendeten Zellkulturmodell kann folglich tatsächlich eine Deaktivierung von Mikrogliazellen durch im Astrozyten-konditionierten Medium gelöste Stoffe angenommen werden. Deshalb wurde der Einfluß von Zytokinen, von denen eine astrozytäre Sekretion in der Literatur nachgewiesen wurde, auf das Ramifikationsverhalten von Mikrogliazellen *in vitro* untersucht.

Durch direkte Zugabe von M-CSF, GM-CSF und TGF- β zum Kulturmedium wurde untersucht, ob diese Zytokine das Ramifikationsverhalten der Mikrogliazellen beeinflussen. Dabei zeigte sich, daß nach eintägiger Inkubation der RI nicht durch TGF- β , jedoch durch M-CSF und GM-CSF beeinflusbar war. Einen RI, der dem von Mikrogliazellen entsprach, die mit ACM inkubiert wurden, konnte man entweder nach Kultivierung mit M-CSF oder nach gemeinsamer Applikation aller drei untersuchten Zytokine beobachten. Dabei spiegelte der Ramifikationsindex jedoch nicht vollständig die veränderten morphologischen Bedingungen wieder. So war der RI für die Mikrogliazellpopulationen annähernd gleich, die mit M-CSF, mit allen drei Zytokinen oder mit ACM behandelt wurden. In der Gestalt unterschieden sich jedoch die mit M-CSF behandelten Mikrogliazellen deutlich von den anderen Gruppen, da sie meistens eine prolongierte, stabförmige Form ohne weitere, sekundäre Verzweigungen besaßen.

Als Gegenkontrolle wurden neutralisierende Antikörper gegen im ACM enthaltenes M-CSF, GM-CSF und TGF- β eingesetzt. Dabei hatte das Zugeben von anti-pan-TGF- β und anti-M-CSF

die stärkste inhibitorische Wirkung auf die Ramifizierung, während der Effekt von anti-GM-CSF sich nur geringfügig im RI widerspiegelte. Aus diesen Daten kann man schlußfolgern, daß vermutlich nicht nur ein Zytokin für die Ramifizierung von Mikrogliazellen notwendig ist.

Problematisch ist die Interpretation der Daten bezüglich des Einflusses von TGF- β auf die Ramifizierung. Während M-CSF und anti-M-CSF einen starken sowie GM-CSF und der entsprechende Antikörper einen schwachen Effekt auf den RI hatten, wiesen die Ergebnisse für TGF- β nicht in eine einheitliche Richtung. Während das Zytokin TGF- β allein nur einen sehr geringen Einfluß auf die Ramifizierung der Mikroglia hatte, wurde die ausgeprägteste Inhibition der ACM induzierten Ramifizierung unter dem Einfluß von anti-pan-TGF- β beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, daß TGF- β für die Ramifizierung ein notwendiger, aber nicht hinreichender Kofaktor zu M-CSF und GM-CSF ist. *In vivo* wäre demzufolge die Deaktivierung durch TGF- β eine Voraussetzung für die M-CSF induzierte Ramifizierung. Möglicherweise wird durch TGF- β die Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale inhibiert, die der Ramifizierung entgegenwirken. Dies wird durch eine Arbeit (Heppner et al. 1998) unterstützt, die nach Zugabe von α -Tocopherol eine verstärkte Ramifizierung der Mikrogliazellen beschreibt. Im Kontrast zu den in dieser Arbeit vorgestellten Daten steht eine Veröffentlichung (Mönning et al. 1994), die den Einfluß von TGF- β auf die Morphologie der Zelllinie BV-2 untersucht und die Behauptung aufstellt, daß diese Zellen nach Stimulation mit TGF- β ramifizieren. Die Ramifizierung ist jedoch nicht quantifiziert worden, wodurch ein Vergleichbarkeit der beiden Arbeiten schwierig ist.

Der Nachweis der Deaktivierung von Mikroglia durch TGF- β konnte in organotypischen Hippokampuskulturen nachgewiesen werden. Dabei zeigten mit ACM oder TGF- β behandelte Makrophagen, die in Hirnschnitte einwanderten, eine Herunterregulierung von Adhäsions- und MHC-Molekülen. Das Ausmaß dieser Deaktivierung war in etwa gleich stark für ACM und TGF- β (Hailer et al. 1998). Weiterhin konnte die Herunterregulierung dieser immunologischen Marker durch Zugabe von anti-TGF- β zum ACM verhindert werden (Hailer et al. 1998). Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß TGF- β das im ACM enthaltene Zytokin ist, das eine verminderte Expression der Adhäsions- und MHC-Moleküle an Mikrogliazellen bewirkt. Über diesen Mechanismus könnten einwandernde Makrophagen deaktiviert werden, um dadurch das immunologische Privileg des Gehirns aufrechtzuerhalten. Diese Deaktivierung würde auch erklären, warum außer bei der multiplen Sklerose, deren Autoimmunogenese noch diskutiert wird, selten meningoenzepmale Symptome bei Autoimmunkrankheiten auftreten (Roitt 1991).

In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten haben Suzumura und Kollegen berichtet, daß Fibroblasten-konditioniertes Medium, das M-CSF enthält, zu einer morphologischen Transformation der Mikroglia führt. Auch in ihren Arbeiten (Suzumura et al. 1991, Suzumura et al. 1990) wiesen die Mikrogliazellen nach Kultivierung mit dem Fibroblasten-konditionierten Medium eine stabförmige Gestalt auf. Eine weitere Unterstützung findet die Aussage durch eine Arbeit, die nach Zugabe eines Antikörpers gegen den M-CSF-Rezeptor eine fehlende Ramifizierung der Mikroglia in Kokultur mit Astrozyten beobachtete (Liu et al. 1994). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in einer anderen Arbeit (Wilms et al. 1997) kein Effekt von Fibroblasten-konditioniertem Medium auf das Ausmaß der Ramifizierung gezeigt werden. Mögliche Gründe für diese Diskrepanz könnten in einer mangelnden Sekretion von M-CSF durch die Fibroblasten, im Einsatz unterschiedlicher Quantifizierungsverfahren oder in der Verwendung unterschiedlicher Spezies liegen.

4.3 Veränderung der Kaliumkanalexpression bei deaktivierter Mikroglia

Da in den mit ACM kultivierten Mikrogliazellen ein häufigeres Auftreten von K^+ -Auswärtsströmen (I_{DR}) beobachtet werden konnte, wurde der dafür verantwortliche Faktor bestimmt, der im Astrozyten-konditionierten Medium enthalten ist. Dazu wurden dem ACM Antikörper gegen TGF- β und GM-CSF hinzugefügt, um diese Zytokine zu neutralisieren. Dabei kam es bei anti-GM-CSF zu keiner nennenswerten Veränderung der mittleren Stromdichte des Auswärtsstromes, während anti-pan-TGF- β die Stromdichte auf das Kontrollniveau reduzierte. Zusätzlich konnte durch die Zugabe von TGF- β eine signifikante Erhöhung der mittleren Stromdichte des Kaliumauswärtsstromes auf mehr als den sechsfachen Wert der Kontrolle erreicht werden, wobei die Isoform von TGF- β keine Rolle zu spielen scheint.

Weil die Anwesenheit von TGF- β sowohl notwendig als auch hinreichend für die Expression der Kaliumauswärtsströme in Mikroglia ist, kann man davon ausgehen, daß dieses Zytokin der von den Astrozyten sezernierte Faktor ist, der für die Hochregulation der Kaliumauswärtsströme verantwortlich ist. Damit ist erstmalig ein deaktivierendes Zytokin beschrieben worden, daß die Induktion von K^+ -Auswärtsströmen an Mikrogliazellen bewirkt.

Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt wurde, konnte für eine Reihe von proinflammatorischen Substanzen ein verstärktes Auftreten von K^+ -Auswärtsströmen beobachtet werden. Dabei wurde in beinahe allen Arbeiten eine gleichzeitige Herunterregulation der einwärts gleichrichtenden Kaliumströme (I_{IR}) beobachtet, so nach Stimulation mit IFN- γ (Draheim et al. 1999, Fischer et al. 1995), für GM-CSF (Fischer et al. 1995) sowie für LPS (Visentin et al. 1995, Draheim et al.

1999). Im Gegensatz dazu wurde die mittlere Stromdichte für den Kaliumeinwärtsstrom durch TGF- β nicht beeinflußt.

Dieser Unterschied im Gleichgewicht zwischen Kaliumein- und -auswärtsströmen könnte funktionell für das Membranpotential von entscheidender Bedeutung sein. So wurde an Mikrogliazellen (Visentin et al. 1995, Chung et al. 1999) oder an Makrophagen (Gallin & Sheehy 1985) beschrieben, daß sowohl die Blockade der Kaliumeinwärtsströme mit Barium als auch der K^+ -Auswärtsströme mit 4-Aminopyridin (4-AP) sich in Änderungen des Membranpotentials niederschlagen. Ausführlicher wird dieses Thema in Kapitel 4.6 erörtert.

4.4 Bestimmung der Kaliumkanaltypen in deaktivierten Mikrogliazellen

Die mit TGF- β kultivierten Mikrogliazellen zeigten demzufolge gegenüber der Kontrollpopulation Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede im Expressionsmuster der spannungsaktivierten Kaliumkanäle. Deshalb wurde untersucht, ob im Vergleich zur Aktivierung mit LPS oder IFN- γ dieselben oder andere Kaliumkanäle nach TGF- β -Exposition in Mikroglia exprimiert wurden.

Der einwärts gleichrichtende Kaliumkanal wird in den meisten der über Mikroglia und Makrophagen veröffentlichten Arbeiten als ein Kanal charakterisiert, der am ehesten dem aus Mausmakrophagen klonierten Kanal Kir2.1 entspricht (Kubo et al. 1993). Der an deaktivierter Mikroglia nachgewiesene Kaliumeinwärtsstrom zeigte passend zu dieser Hypothese die folgenden Charakteristika: Aktivierung bei Potentialen negativ des Kaliumumkehrpotentials, zeitabhängige Stromreduktion bei stark hyperpolarisierenden Pulsen in Anwesenheit von extrazellulärem Na^+ , keine derartige Abnahme der Stromamplitude in Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ , zeit- und spannungsabhängige Blockierbarkeit des Stromes durch extrazelluläres Ba^{2+} im mikromolaren Bereich, keine Inhibition der Stromamplitude durch δ -Dendrotoxin.

In der Mikrogliazelllinie MLS-9 wurde ein einwärts gleichrichtender Strom beschrieben, der den HERG-Kanälen sehr ähnlich ist (Zhou et al. 1998, Pennefather et al. 1998). Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der mit ACM behandelten Mikroglia zeigte der Kaliumeinwärtsstrom bei Abwesenheit von extrazellulärem Natrium keine zeitabhängige Reduktion der Stromamplitude, was im deutlichen Kontrast zu den für die HERG-ähnlichen Kanäle veröffentlichten Ergebnissen steht. Ebenfalls spricht die vollständige Inhibition des Einwärtsstromes durch 1 mM extrazelluläres Ba^{2+} gegen das Vorhandensein von HERG-Kanälen in deaktivierter Mikroglia (Zhou et al. 1998).

Mittels PCR wurde in Mikroglia für den einwärts gleichrichtenden Kaliumstrom neben mRNA-Transkripten für Kir2.1 auch mRNA nachgewiesen, die für den einwärts gleichrichtenden Kanal ROMK1 codiert (Küst et al. 1997, Küst et al. 1999). Da der ROMK1 sensitiv gegenüber nanomolaren Konzentrationen von δ -Dendrotoxin ist (Imredy et al. 1998), kann aufgrund der erhobenen Daten ausgeschlossen werden, daß dieser Kanal in relevanter Weise an dem Kalium-einwärtsstrom deaktivierter Mikrogliazellen beteiligt ist.

Da durch die Wirkung des deaktivierenden Zytokins TGF- β ein Kaliumauswärtsstrom induziert werden konnte, wurde untersucht, welcher spannungsaktivierte Kaliumkanal unter dieser Bedingung exprimiert wurde. Die Kinetik von Ionenströmen ist eine der wesentlichen Eigenschaften zur Distinktion verschiedener Kanaltypen. Deshalb wurden die steady-state Aktivierungs- und Inaktivierungskurven für eine Boltzmannfunktion gefittet, es ergab sich eine halbmaximale Aktivierung von -27 mV bei einer Steigung von $4,6$ mV. Die halbmaximale Inaktivierung wurde mit -38 mV bei einer Steigung von $-4,6$ mV berechnet. Für eine Depolarisation auf $+30$ mV ergaben sich Zeitkonstanten von 3 ms für die Aktivierung und 580 ms für die Inaktivierung. Der Auswärtsstrom zeigte eine starke Amplitudenabnahme bei repetitiver Depolarisation. Diese kinetischen Charakteristika stehen in Übereinstimmung mit den an aktivierten Mikrogliazellen erhobenen Daten (Aktivierung mit LPS: Nörenberg et al. 1994, Aktivierung mit GM-CSF: Eder et al. 1995).

Zur pharmakologischen Charakterisierung wurden die Skorpiontoxine Charybdotoxin und Kaliotoxin sowie ein Toxin der grünen Mamba, α -Dendrotoxin, verwendet. Während Charybdotoxin (CTX) und Kaliotoxin (KTX) bei einer Konzentration von 1 nM eine Reduktion der Stromamplitude um etwa 50 % erreichten, war im Gegensatz dazu auch bei 100 nM α -Dendrotoxin (α -DTX) nur eine Verminderung der Amplitude auf 72 % zu verzeichnen. Ähnliche Effekte wurden in aktivierter Mikroglia für CTX beschrieben (Nörenberg et al. 1994, Eder et al. 1995). Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Daten hatte α -DTX keinen Effekt auf den Auswärtsstrom aktivierter Mikroglia (Eder et al. 1995).

Die experimentell ermittelten Eigenschaften des durch TGF- β induzierten Kaliumauswärtsstromes sind in Tabelle 2 aufgeführt und in Relation zu den der Literatur entnommenen Angaben gesetzt worden. Es wird deutlich, daß am wahrscheinlichsten der Kv1.3 der Kanal ist, der durch TGF- β in Mikrogliazellen induziert wird.

		Kv1.1	Kv1.2	Kv1.3	Kv1.4	Kv1.5	Kv1.6	I _{K TGF-β}
Aktivierung	V _{1/2} (mV)*	-32	27	-26	-34	-14	-17	-27
	k (mV)*	8	13	7	17	12	n.b.	5
Einzelkanal-leitfähigkeit	γ (in pS)	~10	~18	~13	~5	~8	~9	~13**
Zeitabhängige Inaktivierung	τ _h (in ms bei +30 mV)	>1000	nein	~500	nein	>1000	nein	580
Kumulative Inaktivierung		nein	nein	ja	n.b.	nein	n.b.	ja
K _d -Werte verschiedener Toxine (in nM)	Charybdo-toxin	>1000	14	2,6	>1000	>100	1	~1
	Kalioxin	41	>1000	0,6	n.b.	>1000	n.b.	~1
	α-Dendro-toxin	20	17	250	>200	>1000	10	>100

Tabelle 2 Biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften klonierter K⁺-Kanäle (aus Grissmer et al. 1994 und Conley & Brammar 1999); n.b.: nicht bestimmt; I_{K TGF-β}: durch TGF-β in Mikroglia induzierter Kaliumauswärtsstrom; * siehe Gleichung 5; ** bestimmt von DeCoursey und Kollegen

In verschiedenen Immunzellen wurde ein Kaliumauswärtsstrom beschrieben, der je nach Zellart permanent oder stimulationsbedingt exprimiert wird. Dieser Strom wurde in Makrophagen (Ypey & Clapham 1984), in Lymphozyten (DeCoursey et al. 1984, früher als n-Typ bezeichnet) und in aktivierter Mikroglia (Nörenberg et al. 1994, Eder et al. 1995, Draheim et al. 1999) gefunden. Desweiteren wurde mRNA, die für den klonierten Kanal Kv1.3 codiert, in Mikroglia nachgewiesen (Nörenberg et al. 1993, Küst et al. 1999); ebenfalls gelang der immunzytochemische Nachweis von Kv1.3 an Mikrogliazellen aus der Zellkultur (Kotecha & Schlichter 1999).

Zusätzlich zu diesen Resultaten wurden Beweise für die Expression weiterer Kanaltypen, die für Kaliumauswärtsströme verantwortlich sein können, in der Zellkultur gefunden. In den hier vorgestellten Ergebnissen könnte ein Hinweis auf eine Koexpression von Kv1.3 mit anderen Kaliumkanälen der unter CTX und KTX persistierende Auswärtsstrom sein, der auch mit Konzentrationen von 100 nM nicht vollständig inhibierbar war. In der Literatur wurde die Anwesenheit von Kv1.5 mittels Immunhistochemie (Jou et al. 1998) und durch elektrophysiologische Charakterisierung und PCR an Rattenmikrogliazellen belegt, ebenfalls fanden sich Transkripte für den Kv1.2 und Kv1.6 (Kotecha & Schlichter 1999). Diese Untersuchungen belegen jedoch nicht zwingend das Vorhandensein der entsprechenden Kanäle, da durch die PCR

nicht die Synthese der entsprechenden Kanalproteine nachgewiesen wird. Außerdem kann bei den verwendeten Methoden eine Kontamination mit anderen im Gehirn vorhandenen Zellarten nicht ausgeschlossen werden. So wurde Kv1.5 in Astrozyten (Roy et al. 1996) sowie Kv1.4, Kv1.5 und Kv1.6 in Oligodendrozyten (Schmidt et al. 1999) nachgewiesen.

4.5 Einfluß von Proteinkinasen auf den durch TGF- β induzierten Kaliumauswärtsstrom

Proteine unterliegen häufig einer posttranslationalen Modifikation, um schneller auf sich ändernde Bedingungen reagieren zu können. Neben der Oxidation von Proteinbestandteilen ist ein bekannter Mechanismus die Phosphorylierung von Aminosäuren durch Proteinkinasen. Beschrieben ist die Modulation des Kv1.3 in Lymphozyten durch die Proteinkinasen A und C (Deutsch et al. 1986, Payet & Dupuis 1992, Schlichter et al. 1997) sowie durch Proteintyrosinkinasen (Holmes et al. 1996). Desweiteren konnte in Mikroglia eine verstärkte Expression der mRNA für Kv1.3 nach Stimulation von Rezeptoren, die den intrazellulären cAMP-Spiegel anheben, sowie nach pharmakologischer Erhöhung dieses Spiegels beobachtet werden (Küst et al. 1997, Küst et al. 1999). Außerdem gibt es in der Aminosäuresequenz des Kv1.3 aus biochemischer Sicht mögliche Bindungsstellen für die Interaktion mit PKA, PKC und CaMKII (Chandy et al. 1997, Schlichter et al. 1997).

Deshalb war ein weiteres Ziel der Arbeit die Aufklärung der beteiligten intrazellulären Signalkaskaden, die zur Hochregulation des Kaliumauswärtsstromes nach Inkubation von Mikrogliazellen mit TGF- β führen. In einem ersten Ansatz wurde versucht, mittels direkter Stimulation von Proteinkinasen deren Einfluß bei dieser Hochregulation zu untersuchen. Dabei wurde ein Effekt von dBcAMP, einem Aktivator der Proteinkinase A, auf die mittlere Stromdichte der Mikrogliazellen beobachtet. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Stromdichte, die jedoch nicht die Werte erreichte, die üblicherweise nach Kultivierung mit TGF- β gemessen wurden. Eine Inkubation mit PMA, durch welches die Proteinkinase C aktiviert werden sollte, zeigte keinerlei Auswirkungen auf die mittlere Stromdichte der Kaliumauswärtsströme von Mikrogliazellen.

Umgekehrt wurde ebenfalls versucht, mittels verschiedener Proteinkinaseinhibitoren die Induktion des Kaliumauswärtsstromes durch TGF- β zu beeinflussen. Dabei wurde in Experimenten mit dem unspezifischen Proteinkinaseinhibitor H7 nachgewiesen, daß die Expression des Kv1.3 durch TGF- β unterdrückt werden kann. Im Gegensatz dazu konnte in den Experimenten mit spezifischeren Antagonisten gegen Proteinkinase A, Proteinkinase C, Protein-

tyrosinkinase oder Ca^{2+} /Calmodulinkinase II kein signifikanter Unterschied in der mittleren Stromdichte festgestellt werden. Auffällig ist, daß bei allen verwendeten spezifischen Proteinkinaseinhibitoren die Stromdichte des untersuchten Kaliumauswärtsstromes im Vergleich zur Kontrolle geringfügig vermindert ist. Vermutlich ist dafür eine unspezifische Verringerung der Zellviabilität verantwortlich, da die inhibierten Proteinkinasen auch andere, eventuell essentielle, metabolische Prozesse beeinflussen können.

Da die Erhöhung der mittleren Stromdichte der K^+ -Auswärtsströme durch TGF- β erst nach einer Zeitspanne von etwa 12-24 Stunden evident wird, ist es äußerst unwahrscheinlich, daß durch TGF- β eine posttranslationale Modifikation bereits in der Zellmembran vorhandener Kanalproteine bewirkt wird. Vielmehr scheint eine *de novo* Synthese von Kv1.3 Kanälen die Ursache für die Zunahme der Stromdichte des Kaliumauswärtsstromes zu sein; in einem ähnlichen Zeitrahmen wurden nach Transfektion mit Kv1.3 codierender mRNA in einer Monozytenzelllinie neu synthetisierte Kv1.3 Kanäle an der Zellmembran nachweisbar (Chandy et al. 1997). Da in den Versuchen mit Aktivatoren und Inhibitoren von Proteinkinasen keine konsistenten Ergebnisse erzielt wurden, kann man schlußfolgern, daß wahrscheinlich keine der untersuchten Proteinkinasen (PKA, PKC, Proteintyrosinkinase oder CaMKII) am Prozeß der Expression des Kv1.3 nach Stimulation mit TGF- β beteiligt ist.

Es bleibt allerdings nach Ausschluß dieser spezifischen Proteinkinasen zu klären, wie die unter H7 beobachteten Effekte zu erklären sind.

Auch für die beobachtete Inhibition der Erhöhung der mittleren Stromdichte des Kaliumauswärtsstromes nach TGF- β Inkubation durch H7 gibt es keine schlüssige Begründung. Die Experimente mit den spezifischeren Inhibitoren machen eine Beteiligung dieser untersuchten Proteinkinasen unwahrscheinlich. Eine Veröffentlichung zeigt bei analogen Versuchsbedingungen ähnliche Ergebnisse. In einer Lungenepithelzelllinie konnte die TGF- β induzierte Proteinsynthese verschiedener früher Genprodukte ebenfalls mit H7 inhibiert werden, während Staurosporin als spezifischerer PKC-Inhibitor keine Wirkung zeigte (Ohtsuki & Massagué 1992). Eine mögliche Ursache für diesen beobachteten Effekt könnte die Beteiligung einer anderen Proteinkinase sein, die ebenfalls durch H7 inhibiert wird.

In Abbildung 25 ist grafisch die Aktivierung des intrazellulären Signalweges dargestellt, der durch Bindung von TGF- β an die membranständigen Rezeptoren erfolgt. Dadurch wird deutlich, daß sowohl die Aktivierung der Rezeptoren als auch der intrazellulären Botenstoffe, der SMAD-Moleküle, durch Phosphorylierung über Kinasen reguliert wird. Es wurden auch andere

Transduktionsmechanismen mit Beteiligung von Serin-/Threoninkinasen beschrieben (Sano et al. 1999).

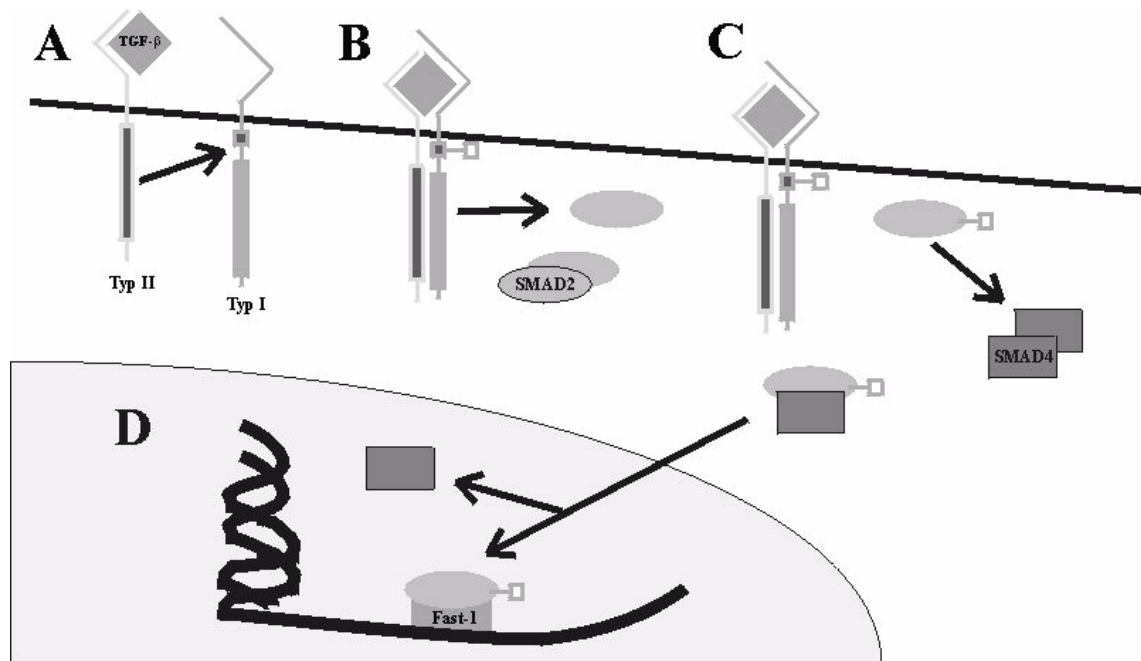


Abbildung 25 intrazellulärer Signalweg der Aktivierung durch TGF- β (nach Baker & Harland 1997): TGF- β bindet an den Typ II Rezeptor, wodurch dieser mit einer Serin-/Threoninkinasedomäne den Typ I Rezeptor in einem glyzin-/serinreichen Teil nahe der Zellmembran phosphoryliert (A); der Rezeptorkomplex phosphoryliert die intrazytoplasmatischen SMAD-Moleküle 1, 2, 3, 5 oder 8 (B) und diese die SMAD-Moleküle 4 (C); der SMAD-Komplex diffundiert in den Zellkern und aktiviert über den Transkriptionsfaktor FAST-1 die Erzeugung der zellspezifischen Genprodukte (D)

Eine andere mögliche Erklärung für die H7 bedingte Inhibition der Expression des Kv1.3 nach Stimulation mit TGF- β könnte die Interaktion der Serum/Glukokortikoid regulierten Proteinkinase (sgk) mit H7 sein. Eine Hochregulation dieser Serin-Threonin Proteinkinase wurde in Makrophagen nach Stimulation mit GM-CSF, LPS und TNF- α (Cowling & Birnboim 2000) sowie nach Stimulation einer Makrophagenzelllinie mit TGF- β 1 (Waldegger et al. 1999) nachgewiesen. Diese Hochregulation konnte nicht durch den Tyrosinkinaseinhibitor Genistein verhindert werden (Cowling & Birnboim 2000). Ebenfalls wurde nachgewiesen, daß eine Überexpression von h-sgk in HEK 293 Zellen zu einer Expression von Kv1.3 führt (Fillon et al. 2000).

In der Literatur sind allerdings keine Untersuchungen von H7 auf die Kinasenregionen von SMAD-Molekülen oder der Serum/Glukokortikoid regulierten Proteinkinase beschrieben;

ebenfalls sind keine spezifischen Inhibitoren für diese Kinasen bekannt, so daß man diese Hypothesen weder bestätigen noch ablehnen kann.

Eine andere Interpretation der Ergebnisse wird durch Untersuchungen gestützt, die in Rattenphäochromozytomzellen eine H7 induzierte Verminderung der *c-fos* Expression nachgewiesen haben, die unabhängig von der Wirkung auf die Proteinkinase C sein soll. Die Autoren (Kumahara et al. 1999) zeigen statt dessen, daß H7 auch die Inhibition der RNA Polymerase II bewirken kann. Somit könnte die TGF- β induzierte Synthese von Kv1.3 Kanalproteinen bereits auf der Ebene der Transkription durch H7 gehemmt werden.

4.6 Funktionelle Bedeutung des Kaliumauswärtsstromes in deaktiverter Mikroglia

Obwohl die Funktion von Ionenkanälen in Immunzellen noch nicht hinreichend erforscht ist, gibt es doch einige Arbeiten, die überzeugend die Beteiligung unterschiedlicher Kanäle an physiologischen und pathophysiologischen Ereigniskaskaden beweisen. An Lymphozyten, bei denen das Membranpotential vor allem durch den Kv1.3 bestimmt wird, wurde eine Beteiligung dieser Kanäle an Apoptose- (Szabò et al. 1997) und Volumenregulationsmechanismen (Deutsch & Chen 1993) gezeigt.

Nur in wenigen Arbeiten wird dagegen die Funktion des Kv1.3 in Mikroglia oder Makrophagen untersucht.

Uneinheitlich sind die erhobenen Befunde hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen der Proliferation von Mikroglia und dem Expressionsniveau des Kv1.3. Die Inhibition der Proliferation und das parallele Auftreten von Kaliumauswärtsströmen, wenn Mikrogliazellen mit LPS (Gebicke-Haerter et al. 1989, Nörenberg et al. 1994) oder TGF- β (Suzumura et al. 1993, Jones et al. 1998, diese Arbeit) kultiviert wurden, legt die Vermutung einer Verbindung zwischen diesen beiden Faktoren nahe. Ebenfalls indirekt wird die Vermutung, daß die Induktion von Kaliumauswärtsströmen die Proliferation von Mikroglia inhibitiert, durch das Fehlen eines Kaliumauswärtsstromes nach Kultivierung mit dem proliferationsförderndem Zytokin M-CSF gestützt (Sawada et al. 1990, Fischer et al. 1995). Dennoch konnte in Veröffentlichungen, in denen die direkte Wirkung von Kaliumkanalblockern auf die Proliferation untersucht wurde, eine Inhibition des Wachstums von Mikrogliazellen (Kotecha & Schlichter 1999) festgestellt werden. Auch das proliferationsfördernde Zytokin GM-CSF kann Kaliumauswärtsströme, die

durch Kv1.3 Kanäle bedingt sind, induzieren. Diese widersprüchlichen Daten sprechen gegen eine Kausalität zwischen der Expression des Kv1.3 und der Proliferation von Mikrogliazellen.

Wahrscheinlich ebenfalls nicht beteiligt ist der Kaliumauswärtsstrom an der Ramifizierung von Mikrogliazellen, da Konzentrationen von 500 nM KTX und CTX nicht die morphologische Transformation nach Zugabe von ACM unterdrücken konnten (Eder et al. 1998).

Immunmodulatorische Effekte des Kv1.3 konnten im Minischwein *in vivo* nachgewiesen werden. Nach Blockade des Kv1.3 mit Margatoxin (Koo et al. 1997) oder Correoliden (Koo et al. 1999) war sowohl die Antikörperreaktion nach alloantigener Stimulation (Wirkung auf B-Lymphozyten) als auch die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion Typ IV auf Tuberkulin (Wirkung auf T-Helferzellen 1 und Makrophagen) inhibiert. Bei *in vivo* Versuchen kann häufig der Beitrag einzelner Komponenten nicht hinreichend aufgeklärt werden. Deshalb sei an dieser Stelle eine Hypothese für den Einfluß des Kv1.3 auf die immunologischen Funktionen von Makrophagen/Mikrogliazellen aufgestellt.

Häufig führen pathophysiologische Bedingungen wie Hypoxie (Blank, Jr. & Kirshner 1977) oder akute (Heinemann et al. 1977) und chronische (Heinemann et al. 1986) paroxysmale Aktivität zu einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, die eine Depolarisation der Mikrogliazellen mit konsekutiv verringerter Öffnungswahrscheinlichkeit der CRAC-Kanäle sowie einer Öffnung von spannungsaktivierten Kalziumkanälen bewirken würde, wodurch die intrazelluläre Kalziumhomöostase moduliert werden könnte. Eine Repolarisation auf das ursprüngliche Membranpotential wird durch den Kv1.3 ermöglicht, da in diesen Bereichen des Membranpotentials der Kir2.1 nicht aktivierbar ist. Würde kein Kv1.3 in den Zellen exprimiert sein, so wäre eine anhaltende Depolarisation die Folge. Diese Depolarisation kann bei transmembranären Proteinen mit geladenen Aminosäuren, wie z.B. bei MHC-Molekülen, eine Konformationsänderung hervorrufen. Eine derartige Beobachtung wurde für MHC Klasse I an einer B-Lymphozytenzelllinie gemacht; die Autoren ziehen aus ihrer Arbeit die Schlußfolgerung, daß durch Veränderungen des Ruhemembranpotentials die Antigenpräsentation beeinflusst werden kann (Bene et al. 1997). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß für Mikroglia, die mit GM-CSF für einen Tag stimuliert wurde, weder eine Veränderung im Membranpotential noch eine Veränderung der Antigenpräsentation nachweisbar war. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Inkubation mit IFN- γ sowohl eine Verschiebung des Ruhemembranpotentials in depolarisierende Richtung als auch eine vermehrte Antigenpräsentation (Fischer et al. 1995). In diese Richtung weisen auch die Resultate einer Arbeit, in der nach-

gewiesen werden konnte, daß durch Depolarisation von antigenpräsentierenden Zellen mittels Zellmembranionophoren die Effektivität zytotoxischer T-Lymphozyten erhöht werden konnte (Bacsó et al. 1996). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß es für eine adäquate Interaktion von Mikrogliazellen und Lymphozyten notwendig zu sein scheint, auch unter pathophysiologischen Bedingungen das Membranpotential nach depolarisierenden Ereignissen wieder repolarisieren zu können. Da TGF- β als ein die Immunreaktion limitierendes Zytokin verzögert nach dem Beginn von pathologischen Vorgängen im Gehirn auftritt, könnte die dadurch bewirkte Expression des Kv1.3 ein sinnvoller Mechanismus sein, durch welchen die Mikrogliazellen auch nach Abklingen der proinflammatorischen Stimuli auf Depolarisationen reagieren können.

Ein anderer immunologisch relevanter Einfluß des Kaliumauswärtsstromes könnte in der Inhibition der Produktion freier Sauerstoffradikale liegen. An Makrophagen konnte eine Verminderung der intra- und extrazellulären Superoxidkonzentration durch den Kaliumkanalöffner Nicorandil gezeigt werden (Pogrebniak et al. 1992). Ebenfalls konnte durch den Kalziumkanalöffner BAY K 8644 die Konzentration von intrazellulärem Superoxid signifikant erhöht werden (Colton et al. 1994). Reoxygenierung von hypoxischer Mikroglia bewirkte eine Verstärkung der Sauerstoffradikalproduktion, die durch Tetraethylammonium (TEA), einen unspezifischen Kaliumkanalblocker, und Nifedipin, einen Kalium- und Kalziumkanalinhibitor, gehemmt werden konnte (Spranger et al. 1998). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Sauerstoffradikalproduktion während des respiratorischen Bursts, vermittelt über die Aktivierung spannungsaktivierter Kalziumkanäle, vom Aktivitätsniveau des Kv1.3 abhängt.

5 Zusammenfassung

Im vergangenen Jahrzehnt wurden vermehrt Hinweise entdeckt, daß Mikrogliazellen nicht nur an der Pathogenese von primär immunologischen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose (MS) oder der HIV-assoziierten Demenz beteiligt sind, sondern auch bei chronisch degenerativen Hirnerkrankungen wie dem Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson eine größere Rolle spielen, als man bisher annahm. Aus diesem Grunde wird in Zukunft die Arbeit zur Physiologie und Pathophysiologie der Mikroglia einen größeren Stellenwert in den Neurowissenschaften einnehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sekundäre Mikrogliakulturen mit Astrozyten-konditioniertem Medium (ACM) in einen deaktivierten Zustand überführt werden können. Dies wurde anhand der relativ schnellen morphologischen Veränderung vom amöboiden zum ramifizierten Zustand mittels der Bestimmung eines Ramifikationsindex und anhand der im Vergleich dazu sehr viel langsameren Herunterregulierung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 sowie des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) Klasse II nachgewiesen. Außerdem wurde eine transiente Hochregulation eines Kaliumauswärtsstromes ohne nennenswerte Veränderung des Kaliumeinwärtsstromes beobachtet, was bisher als ein Indikator für aktivierte Mikroglia gewertet wurde.

Durch den Einsatz von M-CSF, GM-CSF, TGF- β und den gegen sie gerichteten Antikörpern konnte gezeigt werden, daß alle untersuchten Zytokine in unterschiedlichem Maße an der Ramifizierung der Mikrogliazellen beteiligt sind. Nur bei Zugabe aller Zytokine konnte ein morphologisches Bild, wie es sich bei der durch ACM induzierten Ramifizierung zeigt, beobachtet werden. Auch der ermittelte Ramifikationsindex war bei diesen beiden Bedingungen gleich. Im Vergleich dazu konnte bei Zugabe einzelner Zytokine entweder nur eine geringfügige Veränderung des Ramifikationsindex (TGF- β , GM-CSF) oder eine deutlich andere morphologische Gestalt (M-CSF) ermittelt werden. Mit Hilfe der gegen die Zytokine gerichteten Antikörper wurde der Nachweis geführt, daß im ACM diese Zytokine für die morphologische Transformation der Mikrogliazellen verantwortlich waren.

Das Auftreten des Kaliumauswärtsstromes nach Inkubation der Mikrogliazellen mit ACM konnte auf die Wirkung von TGF- β , welches im ACM enthalten ist, zurückgeführt werden. Dies wurde evident, weil das Vorhandensein von TGF- β sowohl notwendig als auch hinreichend für die Expression des Kaliumauswärtsstromes in der Mikrogliazellkultur war. Um den durch ACM in deaktivierter Mikroglia induzierten Kaliumauswärtsstrom genau charakterisieren zu können,

wurde die Bestimmung der kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften von Kaliumkanälen nach Inkubation mit TGF- β vorgenommen.

Die Eigenschaften der Kaliumeinwärtsströme änderten sich nicht bei Mikrogliazellen, die mit ACM oder TGF- β deaktiviert wurden. An Parametern wurde dazu die mittlere Stromdichte, die Barium- und δ -Dendrotoxinsensitivität untersucht. Es wurde kein Anhalt für das unter anderen Zellkulturbedingungen beschriebene Auftreten von ROMK1 oder HERG Strömen in Mikrogliazellen gefunden. Am ehesten entsprach der in deaktivierter Mikroglia beobachtete Kanal dem klonierten Kanal Kir2.1.

In ACM-oder TGF- β kultivierter Mikroglia war eine deutliche Heraufregulierung eines Kaliumauswärtsstromes detektierbar. Dieser Kaliumauswärtsstrom zeigte ein zeitabhängiges Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten, das mit einem Hodgkin-Huxley-Modell einer $n^{4,1}$ -Kinetik am besten beschrieben werden konnte. Die Steady-State-Aktivierungskurve zeigte eine halbmaximale Aktivierung bei einem Potential von -27 mV auf; die Inaktivierungskurve wies einen halbmaximalen Wert bei einem Potential von -38 mV auf. Bei repetitiver Depolarisation mit einer Frequenz von 1 Hz konnte eine deutliche Reduktion der Stromamplitude des untersuchten Kaliumauswärtsstromes in muriner Mikroglia gezeigt werden. Dieser Kaliumauswärtsstrom war im nanomolaren Bereich sehr sensitiv gegenüber Charybdotoxin und Kaliotoxin, während α -Dendrotoxin nur eine geringe Wirkung auf diesen Strom hatte. Damit entspricht der in deaktivierter Mikroglia durch TGF- β induzierte Kaliumauswärtsstrom am ehesten dem klonierten Kanal Kv1.3. Dies ist insofern überraschend, als auch in aktivierter Mikroglia genau dieser Kanal hochreguliert wird.

Die Kv1.3 Expression durch TGF- β war durch den unspezifischen Proteinkinaseinhibitor H7 unterdrückbar. Spezifischere Proteinkinaseinhibitoren gegen Proteinkinase A und Proteinkinase C sowie Inhibitoren gegen Proteintyrosinkinase und Calmodulinkinase II zeigten keinen Effekt auf das Stromdichteniveau des Kaliumauswärtsstromes. Am ehesten ist dieses Ergebnis durch einen Eingriff von H7 in den Signaltransduktionsweg von TGF- β zu erklären, der möglicherweise durch Proteinkinasen moduliert wird.

Über die funktionelle Bedeutung der Expression dieses Kaliumkanales sowohl in aktivierter als auch in deaktivierter Mikroglia kann man heute nur Vermutungen anstellen. Zukünftig kommt es verstärkt darauf an, in funktionellen Tests zu untersuchen, ob die Expression des Kv1.3 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Mikroglialeistungen wie z.B. für Phagozytose, Antigenpräsentation, Sauerstoffradikalproduktion oder Interaktion mit Lymphozyten spielt. Ebenfalls

von, eher medizinischem, Interesse dürfte die Beantwortung der Frage sein, ob und welche Bedeutung die Hochregulation des Kv1.3 in Aktivierungs- und Deaktivierungsprozessen humaner Mikroglia im Rahmen von pathologischen Ereignissen wie z.B. Enzephalitiden, Multipler Sklerose, chronischer Temporallappenepilepsie oder Morbus Alzheimer hat.

6 Literaturverzeichnis

- ADELMAN J. P., Shen K. Z., Kavanaugh M. P., Warren R. A., Wu Y. N., Lagrutta A., Bond C. T. & North R. A. (1992) Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* 9: 209-216.
- ANTEL J. (1999) Multiple sclerosis-emerging concepts of disease pathogenesis. *J.Neuroimmunol.* 98: 45-48.
- ARMSTRONG C. M. & Gilly W. F. (1992) Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. *Methods Enzymol.* 207: 100-122.
- ARTIGAS J., Grosse G. & Niedobitek F. (1993) Neuropathology of AIDS. In: *The central nervous system in AIDS* (Ed. J. Artigas, G. Grosse & F. Niedobitek), S. 79-200 Springer-Verlag, Berlin
- BACHMANN R., Eugster H. P., Frei K., Fontana A. & Lassmann H. (1999) Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am.J.Pathol.* 154: 1417-1422.
- BACSÓ Z., Matkó J., Szöllösi J., Gáspár R., Jr. & Damjanovich S. (1996) Changes in membrane potential of target cells promotes cytotoxic activity of effector T lymphocytes. *Immunol.Lett.* 51: 175-180.
- BAKER C. A., Lu Z. Y., Zaitsev I. & Manuelidis L. (1999) Microglial activation varies in different models of Creutzfeldt-Jakob disease. *J.Virol.* 73: 5089-5097.
- BAKER J. C. & Harland R. M. (1997) From receptor to nucleus: the smad pathway. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 7: 467-473.
- BARRY P. H. & Lynch J. W. (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J.Membr.Biol.* 121: 101-117.
- BÁNFI B., Schrenzel J., Nüsse O., Lew D. P., Ligeti E., Krause K.-H. & Demaurex N. (1999) A novel H^+ conductance in eosinophils: unique characteristics and absence in chronic granulomatous disease. *J.Exp.Med.* 190: 183-194.
- BECHMANN I. & Nitsch R. (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20: 145-154.
- BENE L., Szöllösi J., Balázs M., Mátyus L., Gáspár R., Ameloot M., Dale R. E. & Damjanovich S. (1997) Major histocompatibility complex class I protein conformation altered by transmembrane potential changes. *Cytometry* 27: 353-357.
- BLANK W. F., Jr. & Kirshner H. S. (1977) The kinetics of extracellular potassium changes during hypoxia and anoxia in the cat cerebral cortex. *Brain Res.* 123: 113-124.
- BLASI E., Barluzzi R., Bocchini V., Mazzolla R. & Bistoni F. (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-*raf/v-myc* carrying retrovirus. *J.Neuroimmunol.* 27: 229-237.
- BOK D. & Hall M. O. (1971) The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J.Cell Biol.* 49: 664-682.

- BROWN D. R. & Kretzschmar H. A. (1997) Microglia and prion disease: a review. *Histol.Histopathol.* 12: 883-892.
- CHANDY K. G., Strong M., Aiyar J. & Gutman G. A. (1997) Structural and Biochemical Features of the Kv1.3 Potassium Channel: An Aid to Guided Drug Design. *Cell.Physiol.Biochem.* 7: 135-147.
- CHAO C. C., Hu S. & Peterson P. K. (1995c) Glia, cytokines, and neurotoxicity. *Crit.Rev.Neurobiol.* 9: 189-205.
- CHAO C. C., Hu S., Sheng W. S. & Peterson P. K. (1995b) Tumor necrosis factor- α production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines. *Dev.Neurosci.* 17: 97-105.
- CHAO C. C., Hu S., Sheng W. S., Tsang M. & Peterson P. K. (1995a) Tumor necrosis factor- α mediates the release of bioactive transforming growth factor- β in murine microglial cell cultures. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 77: 358-365.
- CHUNG S., Jung W. & Lee M.-Y. (1999) Inward and outward rectifying potassium currents set membrane potentials in activated rat microglia. *Neurosci.Lett.* 262: 121-124.
- COLE K. S. (1949) Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch.Sci.Physiol.* 3: 253-258.
- COLTON C. A., Jia M., Li M. X. & Gilbert D. L. (1994) K^+ modulation of microglial superoxide production: involvement of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 266: C1650-C1655.
- CONLEY E. C. & Brammar W. J. (1999) *Voltage-Gated Channels*, Vol. IV, Academic Press, San Diego.
- COWLING R. T. & Birnboim H. C. (2000) Expression of serum- and glucocorticoid-regulated kinase (*sgk*) mRNA is up-regulated by GM-CSF and other proinflammatory mediators in human granulocytes. *J.Leukoc.Biol.* 67: 240-248.
- DECOURSEY T. E., Chandy K. G., Gupta S. & Cahalan M. D. (1984) Voltage-gated K^+ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* 307: 465-468.
- DECOURSEY T. E. & Cherny V. V. (1993) Potential, pH, and arachidonate gate hydrogen ion currents in human neutrophils. *Biophys.J.* 65: 1590-1598.
- DEFELICE L. J. (1997) Boltzmann equation. In: *Electrical Properties of Cells. Patch clamp for Biologists* S. 128-134 Plenum Press, New York
- DEL RIO-HORTEGA P. (1932) Microglia. In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (Ed. W. Penfield), Vol. II, S. 481-534 Paul B. Hoeber, New York
- DEUTSCH C. & Chen L.-Q. (1993) Heterologous expression of specific K^+ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 10036-10040.
- DEUTSCH C., Krause D. & Lee S. C. (1986) Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J.Physiol.(Lond.)* 372: 405-423.
- DEWITT D. A., Perry G., Cohen M., Doller C. & Silver J. (1998) Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp.Neurol.* 149: 329-340.

- DI VIRGILIO F., Sanz J. M., Chiozzi P. & Falzoni S. (1999) The P2Z/P2X₇ receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor. *Prog.Brain Res.* 120: 355-368.
- DRAHEIM H. J., Prinz M., Weber J. R., Weiser T., Kettenmann H. & Hanisch U. K. (1999) Induction of potassium channels in mouse brain microglia: cells acquire responsiveness to pneumococcal cell wall components during late development. *Neuroscience* 89: 1379-1390.
- EDER C. (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 275: C327-C342.
- EDER C., Fischer H.-G., Hadding U. & Heinemann U. (1995) Properties of voltage-gated potassium currents of microglia differentiated with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Membr.Biol.* 147: 137-146.
- EDER C. & Heinemann U. (1996) Proton modulation of outward K⁺ currents in interferon- γ -activated microglia. *Neurosci.Lett.* 206: 101-104.
- EDER C., Klee R. & Heinemann U. (1997) Pharmacological properties of Ca²⁺-activated K⁺ currents of ramified murine brain macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 356: 233-239.
- EDER C., Klee R. & Heinemann U. (1998) Involvement of stretch-activated Cl⁻ channels in ramification of murine microglia. *J.Neurosci.* 18: 7127-7137.
- FEDOROFF S., Zhai R. & Novak J. P. (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J.Neurosci.Res.* 50: 477-486.
- FILLON, S., Gamper, N., Huber, S. & Lang, F. Activation of K⁺-channels in HEK 293 cells by overexpressing the serine/threonine kinase h-sgk. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 439, R381. 2000. (Abstract)
- FINSEN B. R., Jørgensen M. B., Diemer N. H. & Zimmer J. (1993) Microglial MHC antigen expression after ischemic and kainic acid lesions of the adult rat hippocampus. *Glia* 7: 41-49.
- FISCHER H.-G., Eder C., Hadding U. & Heinemann U. (1995) Cytokine-dependent K⁺ channel profile of microglia at immunologically defined functional states. *Neuroscience* 64: 183-191.
- FLANDERS K. C., Ren R. F. & Lippa C. F. (1998) Transforming growth factor- β s in neurodegenerative disease. *Prog.Neurobiol.* 54: 71-85.
- FREI K., Siepl C., Groscurth P., Bodmer S., Schwerdel C. & Fontana A. (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon- γ -treated microglial cells. *Eur.J.Immunol.* 17: 1271-1278.
- FUJITA S. & Kitamura T. (1975) Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia. *Acta Neuropathol.Suppl (Berl)* Suppl 6: 291-296.
- GALLIN E. K. & Sheehy P. A. (1985) Differential expression of inward and outward potassium currents in the macrophage-like cell line J774.1. *J.Physiol (Lond)* 369: 475-499.
- GEBICKE-HAERTER P. J., Bauer J., Schobert A. & Northoff H. (1989) Lipopolysaccharide-free conditions in primary astrocyte cultures allow growth and isolation of microglial cells. *J.Neurosci.* 9: 183-194.
- GONZÁLEZ-SCARANO F. & Baltuch G. (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu.Rev.Neurosci.* 22: 219-240.

- GRAEBER M. B., Streit W. J. & Kreutzberg G. W. (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J.Neurosci.Res.* 21: 18-24.
- GRAU V., Herbst B., van der Meide P. H. & Steiniger B. (1997) Activation of microglial and endothelial cells in the rat brain after treatment with interferon-gamma in vivo. *Glia* 19: 181-189.
- GRISMER S., Nguyen A. N., Aiyar J., Hanson D. C., Mather R. J., Gutman G. A., Karmilowicz M. J., Auperin D. D. & Chandy K. G. (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol.Pharmacol.* 45: 1227-1234.
- HAILER N. P., Heppner F. L., Haas D. & Nitsch R. (1998) Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol.* 8: 459-474.
- HAILER N. P., Järhult J. D. & Nitsch R. (1996) Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18: 319-331.
- HAMILL O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflug.Arch.Eur.J.Phys.* 391: 85-100.
- HEINEMANN U., Konnerth A., Pumain R. & Wadman W. J. (1986) Extracellular calcium and potassium concentration changes in chronic epileptic brain tissue. In: *Advances in neurology / Basic mechanisms of the epilepsies* (Ed. A. V. Delgado-Escueta, A. A. Ward, D. M. Woodbury & R. J. Porter), S. 641-661 Raven Press, New York
- HEINEMANN U., Lux H. D. & Gutnick M. J. (1977) Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp.Brain Res.* 27: 237-243.
- HELLENDALL R. P. & Ting J. P. Y. (1997) Differential regulation of cytokine-induced major histocompatibility complex class II expression and nitric oxide release in rat microglia and astrocytes by effectors of tyrosine kinase, protein kinase C, and cAMP. *J.Neuroimmunol.* 74: 19-29.
- HEPPNER F. L., Roth K., Nitsch R. & Hailer N. P. (1998) Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia* 22: 180-188.
- HODGKIN A. L. & Huxley A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J.Physiol.(Lond.)* 117: 500-544.
- HOLEVINSKY K. O. & Nelson D. J. (1998) Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. *Biophys.J.* 75: 2577-2586.
- HOLMES T. C., Fadool D. A. & Levitan I. B. (1996) Tyrosine phosphorylation of the Kv1.3 potassium channel. *J.Neurosci.* 16: 1581-1590.
- ILSCHNER S., Nolte C. & Kettenmann H. (1996) Complement factor C5a and epidermal growth factor trigger the activation of outward potassium currents in cultured murine microglia. *Neuroscience* 73: 1109-1120.
- IMREDY J. P., Chen C. & MacKinnon R. (1998) A snake toxin inhibitor of inward rectifier potassium channel ROMK1. *Biochemistry* 37: 14867-14874.
- JACK J. J. B., Noble D. & Tsien R. W. (1975) *Electric current flow in excitable cells*, Clarendon Press, Oxford.

- JOINER W. J., Wang L. Y., Tang M. D. & Kaczmarek L. K. (1997) hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 11013-11018.
- JONES L. L., Kreutzberg G. W. & Raivich G. (1998) Transforming growth factor β 's 1, 2 and 3 inhibit proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer. *Brain Res.* 795: 301-306.
- JOU I., Pyo H., Chung S., Jung S. Y., Gwag B. J. & Joe E. H. (1998) Expression of Kv1.5 K⁺ channels in activated microglia in vivo. *Glia* 24: 408-414.
- KETTENMANN H., Hoppe D., Gottmann K., Banati R. & Kreutzberg G. (1990) Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J.Neurosci.Res.* 26: 278-287.
- KLEE R., Heinemann U. & Eder C. (1999) Voltage-gated proton currents in microglia of distinct morphology and functional state. *Neuroscience* 91: 1415-1424.
- KONNERTH A., Lux H. D. & Morad M. (1987) Proton-induced transformation of calcium channel in chick dorsal root ganglion cells. *J.Physiol.(Lond.)* 386: 603-633.
- KOO G. C., Blake J. T., Shah K., Staruch M. J., Dumont F., Wunderler D., Sanchez M., McManus O. B., Sirotina-Meisher A., Fischer P., Boltz R. C., Goetz M. A., Baker R., Bao J., Kayser F., Rupprecht K. M., Parsons W. H., Tong X. C., Ita I. E., Pivnichny J., Vincent S., Cunningham P., Hora D., Jr., Feeney W., Kaczorowski G. & Springer M. S. (1999) Correolide and Derivatives Are Novel Immunosuppressants Blocking the Lymphocyte Kv1.3 Potassium Channels. *Cell Immunol.* 197: 99-107.
- KOO G. C., Blake J. T., Talento A., Nguyen M., Lin S., Sirotina A., Shah K., Mulvany K., Hora D., Jr., Cunningham P., Wunderler D. L., McManus O. B., Slaughter R., Bugianesi R., Felix J., Garcia M., Williamson J., Kaczorowski G., Sigal N. H., Springer M. S. & Feeney W. (1997) Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J.Immunol.* 158: 5120-5128.
- KOTECHE S. A. & Schlichter L. C. (1999) A Kv1.5 to Kv1.3 Switch in Endogenous Hippocampal Microglia and a Role in Proliferation. *J.Neurosci.* 19: 10680-10693.
- KREUTZBERG G. W. (1968) Über perineuronale Mikrogliazellen (autoradiographische Untersuchung). *Acta Neuropathol.(Berl)* 7: 149-161.
- KRIEGLSTEIN K., Rufer M., Suter-Crazzolara C. & Unsicker K. (1995) Neural functions of the transforming growth factors β . *Int.J.Dev.Neurosci.* 13: 301-315.
- KUBO Y., Baldwin T. J., Jan Y. N. & Jan L. Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362: 127-133.
- KUMAHARA E., Ebihara T. & Saffen D. (1999) Protein kinase inhibitor H7 blocks the induction of immediate-early genes *zif268* and *c-fos* by a mechanism unrelated to inhibition of protein kinase C but possibly related to inhibition of phosphorylation of RNA polymerase II. *J.Biol.Chem.* 274: 10430-10438.
- KÜST B., Buttini M., Sauter A., Boddeke H. W. & Gebicke-Haerter P. J. (1997) K⁺-channels and cytokines as markers for microglial activation. *Adv.Exp.Med.Biol.* 429: 109-117.
- KÜST B. M., Biber K., Van Calcar D. & Gebicke-Haerter P. J. (1999) Regulation of K⁺ channel mRNA expression by stimulation of adenosine A_{2a}-receptors in cultured rat microglia. *Glia* 25: 120-130.

- LAWSON L. J., Perry V. H. & Gordon S. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48: 405-415.
- LING E. A. & Wong W. C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7: 9-18.
- LIU W., Brosnan C. F., Dickson D. W. & Lee S. C. (1994) Macrophage colony-stimulating factor mediates astrocyte-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture. *Am.J.Pathol.* 145: 48-53.
- LOUGHLIN A. J., Woodroffe M. N. & Cuzner M. L. (1993) Modulation of interferon- γ -induced major histocompatibility complex class II and Fc receptor expression on isolated microglia by transforming growth factor- β 1, interleukin-4, noradrenaline and glucocorticoids. *Immunology* 79: 125-130.
- MARTY A. & Neher E. (1995) Tight-seal whole-cell recording. In: *Single-channel recording* (Ed. B. Sakmann & E. Neher), 2. Aufl., S. 31-51 Plenum Press, New York
- MATTSON M. P., Barger S. W., Furukawa K., Bruce A. J., Wyss-Coray T., Mark R. J. & Mucke L. (1997) Cellular signaling roles of TGF β , TNF α and β APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 23: 47-61.
- MCLARNON J. G., Xu R., Lee Y. B. & Kim S. U. (1997) Ion channels of human microglia in culture. *Neuroscience* 78: 1217-1228.
- MOORE S. & Thanos S. (1996) The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog.Neurobiol.* 48: 441-460.
- MÖLLER T., Nolte C., Burger R., Verkhratsky A. & Kettenmann H. (1997) Mechanisms of C5a and C3a complement fragment-induced $[Ca^{2+}]_i$ signaling in mouse microglia. *J.Neurosci.* 17: 615-624.
- MÖNNING U., Sandbrink R., Banati R. B., Masters C. L. & Beyreuther K. (1994) Transforming growth factor β mediates increase of mature transmembrane amyloid precursor protein in microglial cells. *FEBS Lett.* 342: 267-272.
- MÜLLER W. & Lux H. D. (1993) Analysis of voltage-dependent membrane currents in spatially extended neurons from point-clamp data. *J.Neurophysiol.* 69: 241-247.
- NICOLETTI F., Di Marco R., Patti F., Reggio E., Nicoletti A., Zaccane P., Stivala F., Meroni P. L. & Reggio A. (1998) Blood levels of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) are elevated in both relapsing remitting and chronic progressive multiple sclerosis (MS) patients and are further augmented by treatment with interferon- β 1b (IFN- β 1b). *Clin.Exp.Immunol.* 113: 96-99.
- NISSL F. (1891) Über einige Beziehungen zwischen Nervenzellenerkrankungen und gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch.Psych.* 32: 1-21.
- NÖRENBERG W., Appel K., Bauer J., Gebicke-Haerter P. J. & Illes P. (1993) Expression of an outwardly rectifying K⁺ channel in rat microglia cultivated on teflon. *Neurosci.Lett.* 160: 69-72.
- NÖRENBERG W., Cordes A., Blöbbaum G., Fröhlich R. & Illes P. (1997) Coexistence of purino- and pyrimidinoceptors on activated rat microglial cells. *Br.J.Pharmacol.* 121: 1087-1098.
- NÖRENBERG W., Gebicke-Haerter P. J. & Illes P. (1992) Inflammatory stimuli induce a new K⁺ outward current in cultured rat microglia. *Neurosci.Lett.* 147: 171-174.

- NÖRENBERG W., Gebicke-Haerter P. J. & Illes P. (1994) Voltage-dependent potassium channels in activated rat microglia. *J.Physiol.(Lond.)* 475: 15-32.
- NUMBERGER M. & Draguhn A. (1996) *Patch-Clamp-Technik*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- O'KEEFE G. M., Nguyen V. T. & Benveniste E. N. (1999) Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF- β , IL-4, IL-13 and IL-10. *Eur.J.Immunol.* 29: 1275-1285.
- OHTSUKI M. & Massagué J. (1992) Evidence for the involvement of protein kinase activity in transforming growth factor- β signal transduction. *Mol.Cell Biol.* 12: 261-265.
- ONO K., Takii T., Onozaki K., Ikawa M., Okabe M. & Sawada M. (1999) Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP-expressing bone marrow chimera. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 262: 610-614.
- OWEN M. (1991) Haupthistokompatibilitätskomplex. In: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* (Ed. I. M. Roitt, J. Brostoff & D. K. Male), 2. Aufl., S. 42-53 Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- PAYET M. D. & Dupuis G. (1992) Dual regulation of the *n* type K⁺ channel in Jurkat T lymphocytes by protein kinases A and C. *J.Biol.Chem* 267: 18270-18273.
- PENNEFATHER P. S., Zhou W. & DeCoursey T. E. (1998) Idiosyncratic gating of HERG-like K⁺ channels in microglia. *J.Gen.Physiol.* 111: 795-805.
- PERRY V. H., Hume D. A. & Gordon S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15: 313-326.
- POGREBNIAK H. W., Matthews W. & Pass H. I. (1992) Alterations in macrophage free radical and tumor necrosis factor production by a potassium channel activator. *J.Surg.Res.* 52: 395-400.
- PRATT B. M. & McPherson J. M. (1997) TGF- β in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 267-292.
- PROVIS J. M., Diaz C. M. & Penfold P. L. (1996) Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect.Dev.Neurobiol.* 3: 213-222.
- PUSCH M. & Neher E. (1988) Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflug.Arch.Eur.J.Phys.* 411: 204-211.
- RALL W. (1977) Core conductor theory and cable properties of neurons. In: *Handbook of Physiology.The Nervous System* (Ed. J. M. Brookhart & V. B. Mountcastle), S. 39-97 Am.Physiol.Soc., Bethesda,MD
- ROITT I. M. (1991) Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen. In: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* (Ed. I. M. Roitt, J. Brostoff & D. K. Male), 2. Aufl., S. 305-316 Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- ROOK G. (1991a) Immunität gegen Viren, Bakterien und Pilze. In: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* (Ed. I. M. Roitt, J. Brostoff & D. K. Male), 2. Aufl., S. 195-211 Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- ROOK G. (1991b) Zellvermittelte Immunantwort. In: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie* (Ed. I. M. Roitt, J. Brostoff & D. K. Male), 2. Aufl., S. 102-115 Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- ROY M. L., Saal D., Perney T., Sontheimer H., Waxman S. G. & Kaczmarek L. K. (1996) Manipulation of the delayed rectifier Kv1.5 potassium channel in glial cells by antisense oligodeoxynucleotides. *Glia* 18: 177-184.
- SANO Y., Harada J., Tashiro S., Gotoh-Mandeville R., Maekawa T. & Ishii S. (1999) ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor- β signaling. *J.Biol.Chem.* 274: 8949-8957.
- SARCHIELLI P., Orlacchio A., Vicinanza F., Pelliccioli G. P., Tognoloni M., Saccardi C. & Gallai V. (1997) Cytokine secretion and nitric oxide production by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 80: 76-86.
- SAWADA M., Suzumura A., Yamamoto H. & Marunouchi T. (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res.* 509: 119-124.
- SCHLICHTER L. C., Chung I. & Chang M. C. (1997) Regulation of Kv1.3 Channels in T Lymphocytes by Serine/Threonine Phosphorylation. *Cell.Physiol.Biochem.* 7: 159-171.
- SCHLICHTER L. C., Sakellaropoulos G., Ballyk B., Pennefather P. S. & Phipps D. J. (1996) Properties of K⁺ and Cl⁻ channels and their involvement in proliferation of rat microglial cells. *Glia* 17: 225-236.
- SCHMIDT K., Eulitz D., Veh R. W., Kettenmann H. & Kirchhoff F. (1999) Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the *shaker* family (Kv1) in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res.* 843: 145-160.
- SCHMIDTMAYER J., Jacobsen C., Miksch G. & Sievers J. (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane currents. *Glia* 12: 259-267.
- SCHROETER M., Jander S., Huitinga I., Witte O. W. & Stoll G. (1997) Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke* 28: 382-386.
- SHATWELL K. P. & Segal A. W. (1996) NADPH oxidase. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 28: 1191-1195.
- SHRIKANT P., Weber E., Jilling T. & Benveniste E. N. (1995) Intercellular adhesion molecule-1 gene expression by glial cells. Differential mechanisms of inhibition by IL-10 and IL-6. *J.Immunol.* 155: 1489-1501.
- SIEVERS J., Parwaresch R. & Wottge H.-U. (1994) Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: morphology. *Glia* 12: 245-258.
- SPRANGER M., Kiprianova I., Krempien S. & Schwab S. (1998) Reoxygenation increases the release of reactive oxygen intermediates in murine microglia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 18: 670-674.
- STOLL G. & Jander S. (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog.Neurobiol.* 58: 233-247.
- STREIT W. J., Graeber M. B. & Kreutzberg G. W. (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1: 301-307.

- SUDO S., Tanaka J., Toku K., Desaki J., Matsuda S., Arai T., Sakanaka M. & Maeda N. (1998) Neurons induce the activation of microglial cells *in vitro*. *Exp.Neurol.* 154: 499-510.
- SUZUMURA A., Marunouchi T. & Yamamoto H. (1991) Morphological transformation of microglia *in vitro*. *Brain Res.* 545: 301-306.
- SUZUMURA A., Sawada M. & Marunouchi T. (1996) Selective induction of interleukin-6 in mouse microglia by granulocyte- macrophage colony-stimulating factor. *Brain Res.* 713: 192-198.
- SUZUMURA A., Sawada M., Yamamoto H. & Marunouchi T. (1990) Effects of colony stimulating factors on isolated microglia *in vitro*. *J.Neuroimmunol.* 30: 111-120.
- SUZUMURA A., Sawada M., Yamamoto H. & Marunouchi T. (1993) Transforming growth factor- β suppresses activation and proliferation of microglia *in vitro*. *J.Immunol.* 151: 2150-2158.
- SZABÒ I., Gulbins E. & Lang F. (1997) Regulation of Kv1.3 during Fas-Induced Apoptosis. *Cell.Physiol.Biochem.* 7: 148-158.
- TANAKA J. & Maeda N. (1996) Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Exp.Neurol.* 137: 367-375.
- TANAKA J., Toku K., Matsuda S., Sudo S., Fujita H., Sakanaka M. & Maeda N. (1998) Induction of resting microglia in culture medium devoid of glycine and serine. *Glia* 24: 198-215.
- ULLOA L., Doody J. & Massagué J. (1999) Inhibition of transforming growth factor- β /SMAD signalling by the interferon- γ /STAT pathway. *Nature* 397: 710-713.
- VISENTIN S., Agresti C., Patrizio M. & Levi G. (1995) Ion channels in rat microglia and their different sensitivity to lipopolysaccharide and interferon- γ . *J.Neurosci.Res.* 42: 439-451.
- VISENTIN S. & Levi G. (1997) Protein kinase C involvement in the resting and interferon- γ -induced K⁺ channel profile of microglial cells. *J.Neurosci.Res.* 47: 233-241.
- VISENTIN S., Renzi M., Frank C., Greco A. & Levi G. (1999) Two different ionotropic receptors are activated by ATP in rat microglia. *J.Physiol (Lond)* 519: 723-736.
- VON ZAHN J., Möller T., Kettenmann H. & Nolte C. (1997) Microglial phagocytosis is modulated by pro- and anti-inflammatory cytokines. *NeuroReport* 8: 3851-3856.
- WALDEGGER S., Klingel K., Barth P., Sauter M., Lanzendörfer M. L., Kandolf R. & Lang F. (1999) *h-sgk* serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor β in human intestine. *Gastroenterology* 116: 1081-1088.
- WILMS H., Hartmann D. & Sievers J. (1997) Ramification of microglia, monocytes and macrophages *in vitro*: influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. *Cell Tissue Res.* 287: 447-458.
- YELLEN G., Sodickson D., Chen T. Y. & Jurman M. E. (1994) An engineered cysteine in the external mouth of a K⁺ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys.J.* 66: 1068-1075.
- YPEY D. L. & Clapham D. E. (1984) Development of a delayed outward-rectifying K⁺ conductance in cultured mouse peritoneal macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81: 3083-3087.

ZHOU W., Cayabyab F. S., Pennefather P. S., Schlichter L. C. & DeCoursey T. E. (1998) HERG-like K⁺ channels in microglia. *J.Gen.Physiol.* 111: 781-794.

7 Chemikaliennachweis

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern sie nicht in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt sind, von Sigma-Aldrich, Deutschland erworben.

Bezugsfirma	Produkt
Calbiochem-Novabiochem GmbH	PKA-Inhibitor (14-22), myristoyliert
	PKC-Inhibitor (19-27), myristoyliert
Camon/Serotec, Deutschland	anti-rat biotinylierter sekundärer Antikörper
	rat anti-mouse ICAM-1
	rat anti-mouse LFA-1 α
	rat anti-mouse MHC class II
Gibco BRL, Deutschland	FCS
	L-Glutamin
	PBS
	Penicillin/Streptomycin
	DMEM
Latoxan, Frankreich	CTX
	KTX
	α -DTX
Merck, Deutschland	D-Glucose
	H ₂ O ₂
	KCl
	KOH
	NaOH
R&D Systems GmbH, Deutschland	rmGM-CSF
	rmM-CSF
	anti-mM-CSF
Serva, Boehringer Ingelheim, Deutschland	Glutaraldehyd
Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	ABC
	NGS

8 Erklärung zur Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften

EDER C., Schilling T., Heinemann U., Haas D., Hailer N. & Nitsch R. (1999) Morphological, immunophenotypical and electrophysiological properties of resting microglia *in vitro*. *European J.Neurosci.* 11: 4251-4261.

RICHTER M., Schilling T. & Müller W. (1999) Muscarinic control of intracortical connections to layer II in rat entorhinal cortex slice. *Neurosci Lett.* 273: 200-202.

SCHILLING T., Quandt F. N., Cherny V. V., Zhou W., Heinemann U., DeCoursey T. E. & Eder C. (2000) Upregulation of Kv1.3 K⁺ channels in microglia deactivated by TGF- β . *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 279: 1123-1134.

SCHILLING T., Nitsch R., Heinemann U., Haas D. & Eder C. Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signaling pathways *European J.Neurosci.* in press

Abstrakta

SCHILLING T., Heinemann U., Draguhn A. & Eder C. Up-regulation of outward K⁺ channels in cultured microglia by ACM and TGF- β . *Soc.Neurosci.Abstr.* 25[Part 2], 2007-2007. 1999.

SCHILLING T., Cherny V. V., Zhou W., Quandt F. N., Heinemann U., DeCoursey T. E. & Eder C. TGF- β upregulates Kv1.3 channels in microglia. *Biophys.J.* 78, 207A. 2000.

SCHILLING T., Gratopp A., Heinemann U. & Eder C. Electrophysiological properties of voltage-activated proton currents in human leukemic T cells. *Biophys.J.* 78, 351A. 2000.

SCHILLING T., Cherny V. V., Zhou W., Quandt F. N., Heinemann U., DeCoursey T. E. & Eder C. K⁺ channel expression in deactivated microglia. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* 439[Suppl. 6], R428-R428. 2000.

9 Danksagung

Hiermit danke ich von ganzem Herzen meinem Vater Horst Schilling, meiner Großmutter Dorothea Schilling sowie Jens Wiese, die mich durch ihre vielseitige Hilfe unterstützt haben und es mir ermöglichten, mich auf meine Arbeit zu konzentrieren.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Eder danke ich für die exzellente Betreuung, die anregenden Diskussionen sowie die herzliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe. „Nur wer selbst brennt, kann Feuer in anderen entfachen.“ (Augustinus)

Unserem Institutsdirektor, Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die konstruktiven Anregungen sowie die Bereitstellung technischer und materieller Voraussetzungen, die eine schöpferische Entwicklung der Arbeit ermöglichten.

Frau Astrid Düerkop möchte ich für die Hilfe bei organisatorischen Belangen und die Beschaffung der Literatur danken. „Um zu lachen, muß man ein Gesicht haben.“ (Wladimir Majakowski)

Einen ganz besonderen Dank gebührt auch Frau Sieglinde Latta, ohne deren Betreuung der Mikroliakulturen diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Einen ebenso hohen Stellenwert hatte die hervorragende Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Robert Nitsch und Frau Dorit Haas aus dem Institut für Anatomie. Frau Haas möchte ich für die ungewöhnlich hohe Selbständigkeit bei der Anfertigung der Präparate danken.

Nicole Reimer, Stien Töppich und Kristina Futh möchte ich für die Durchsicht des Manuskriptes und die konstruktiven Kommentare danken.

Weiterhin danke ich den Kollegen unseres Institutes, die ich hier zwar nicht namentlich erwähne, die aber durch die Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas zum Erfolg dieser Arbeit beitrugen.

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche
erforscht zu haben und das Unerforschliche ruhig zu verehren.

Johann Wolfgang von Goethe

10 Erklärung über die Selbständigkeit bei der Anfertigung der Arbeit

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß die vorgelegte Dissertation ohne fremde Hilfe verfaßt wurde und daß die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben wurden.

Berlin, 22.08.2000

Tom Schilling